

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Vogt

Assoziation zwischen 25(OH)D-Serumspiegel und Genvarianten (SNPs) mit Bezug zur Hautpigmentierung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von: Roman Frederik Saturnus

geb. am: 11.07.1989 in Saarbrücken

Für meine Eltern Ingeborg und Stefan Saturnus

und meine Schwester Lisa Saturnus

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
1.1. <i>Deutsche Zusammenfassung</i>	1
1.2. <i>Summary</i>	2
2. Einleitung	3
2.1. <i>Bedeutung des Vitamin D für die menschliche Gesundheit</i>	3
2.2. <i>Der Vitamin D-Stoffwechsel des Menschen und Faktoren, die den Vitamin D-Status beeinflussen</i>	6
2.3. <i>Die Hautpigmentierung des Menschen</i>	19
2.4. <i>Polymorphismen</i>	25
2.5. <i>Fragestellung</i>	26
3. Material und Methoden	27
3.1. <i>Die Studienpopulation: LURIC-Studie</i>	27
3.2. <i>Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank</i>	28
3.3. <i>Statistische Methoden</i>	31
4. Ergebnisse	38
4.1. <i>Test auf Normalverteilung</i>	38
4.2. <i>Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test</i>	39
4.3. <i>Chi-Quadrat-Test</i>	46
4.4. <i>Korrektur für multiples Testen</i>	52

4.5.	<i>Hardy-Weinberg-Equilibrium</i>	55
4.6.	<i>Allelbasierte Tests</i>	58
4.7.	<i>Erklärte Varianz</i>	62
4.8.	<i>Adjustierung</i>	62
4.9.	<i>Überlebenszeitanalyse</i>	63
4.10.	<i>Schematische Übersicht</i>	76
5.	Diskussion	77
6.	Literaturverzeichnis	84
7.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	91
7.1.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	91
7.2.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	93
8.	Danksagung	94
9.	Lebenslauf	95

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

HINTERGRUND: Vitamin D-Mangel ist in der kaukasischen Bevölkerung weit verbreitet. Er ist assoziiert mit einer erhöhten Inzidenz und einer schlechten Prognose von vielen Krankheiten, darunter Malignome, Infektionen, kardiovaskuläre und Autoimmunkrankheiten. Individuelle Faktoren, die den Vitamin D-Spiegel beeinflussen, wie z. B. der Hauttyp, sind bereits identifiziert, aber nur wenige Daten zu genetischen Determinanten des 25(OH)D-Serumspiegels sind bekannt. In dieser Arbeit wurde die Hypothese analysiert, ob SNPs in Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung mit dem 25(OH)D-Serumspiegel assoziiert sind.

PATIENTEN UND METHODEN: 25(OH)D-Werte (Median: 15,5 ng/ml) und SNPs (n=960) in Genen (bzw. deren Umgebung) mit Bezug zur Hautpigmentierung (n=29), wurden in einer Kohorte von Teilnehmern der LURIC-Studie untersucht (n=2970). Es wurden Gene analysiert, die für (a) Enzyme kodieren, die in die Melaninsynthese eingebunden sind (TYR, TYRP1, DCT), (b) Proteine kodieren, die innerhalb der Melanosomenmembran lokalisiert sind und die Ionenkonzentration, den pH-Wert und den Transport kleiner Moleküle beeinflussen, (c) Proteine kodieren, die in Melanozytensignalwege eingebunden sind (ASIP, ATF1, MITF, POMC, PRKACB, PRKACG, PRKAR1A, PRKAR2A, PRKAR2B, TUBB3/MC1R) und (d) Proteine kodieren, die über andere Mechanismen mit der Hautpigmentierung assoziiert sind.

ERGEBNISSE: 46 SNPs waren mit erhöhten oder erniedrigten 25(OH)D-Serumkonzentrationen assoziiert ($p < 0.05$). Von diesen 46 SNPs erreichten 12 das geforderte Signifikanzniveau auch nach Korrektur für multiples Testen, wobei der höchste $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ -Wert ($> 5,00$ ng/ml) mit einem SNP im EXOC2-Gen assoziiert war. Die übrigen 11 SNPs, die ebenfalls das geforderte Signifikanzniveau erreichten, waren in den Genen TYR (n=4), PRKACG (n=1), EDN1 (n=3), TYRP1 (n=1) und MITF (n=2) lokalisiert und waren mit 25(OH)D-Werten zwischen 0,10 und 3,90 ng/ml assoziiert. 9 SNPs in den Genen DCT (n=1), TYRP1 (n=3), PRKAR2B (n=1), FGF2 (n=1), OCA2 (n=2) und EDN3 (n=1) erreichten nach Korrektur für multiples Testen nicht das geforderte Signifikanzniveau aber waren mit hohen $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ -Werten ($> 5,00$ ng/ml) assoziiert. Nach Adjustierung für Geschlecht, BMI, Monat der Blutabnahme und Geburtsjahr konnten die 3 SNPs rs2150097 (TYRP1), rs7356986 (EDN1) und rs12001326 (PRKACG) ihre Signifikanz beibehalten. Um abzuschätzen, welchen Anteil der Varianz der 25(OH)D-Werte durch die SNPs erklärt wird, wurden Determinationskoeffizienten (R^2) für die 12 signifikanten SNPs und für die 46 SNPs ermittelt, welche 1,8 % bzw. 5,6 % betrugen. Schließlich wurden die Auswirkungen der SNPs auf die Lebenserwartung untersucht. In der Kaplan-Meier-Kurve und der Cox-Regression konnte kein Einfluss eines SNPs auf das Gesamtüberleben gefunden werden.

SCHLUSSFOLGERUNGEN: Genvarianten mit Bezug zur Hautpigmentierung sind mitbestimmend für die 25(OH)D-Werte in der kaukasischen Bevölkerung. Von den Varianten in 29 analysierten Genen haben Varianten in insgesamt 11 Genen, darunter EXOC2, TYR, TYRP1, OCA2 und DCT den stärksten Einfluss auf den Vitamin D-Status. Diese Ergebnisse haben eine wichtige Bedeutung für ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von Sonnenlicht, Hautpigmentierung und Vitamin D und wahrscheinlich auch für die Entwicklung des Menschen im Rahmen der Evolution.

1.2. Summary

Genetic variants (SNPs) of genes involved in skin pigmentation are associated with vitamin D concentrations

BACKGROUND: Vitamin D deficiency is common in the Caucasian population and is associated with increased incidence and unfavorable outcome of many diseases, including various types of cancer, infectious, cardio-vascular, and autoimmune diseases. Individual factors that predispose for a person's vitamin D status, such as skin type, have been identified, but limited data exist on genetic determinants of serum 25(OH)D concentration. We tested the hypothesis that variants of genes (SNPs) involved in skin pigmentation are predictive of serum 25(OH)D levels.

PATIENTS AND METHODS: Serum 25(OH)D (Median of the total cohort: 15.5 ng/ml) and SNPs (n=960) related to genes (n=29) with relevance for skin pigmentation were analyzed in a cohort of participants of the LURIC study (n=2970). Genes that encode for (a) enzymes involved in melanin synthesis (TYR, TYRP1, DCT), (b) proteins situated in the melanosome membrane which influence ionic concentration, pH value and transport of small molecules (OCA2, TPCN2, SLC24A4, SLC45A2), (c) genes involved in melanocytic signalling pathways (ASIP, ATF1, MITF, POMC, PRKACB, PRKACG, PRKAR1A, PRKAR2A, PRKAR2B, TUBB3/MC1R), or (d) genes that are associated with skin pigmentation via other mechanisms (CDH1, CTNNA1, EDN1, EDN3, EDNRB, FGF2, KIT, KITLG, NGF, IRF4, EXOC2, TP53) were investigated.

RESULTS: Forty-six SNPs were predictive ($p < 0.05$) for low or high serum 25(OH)D levels. While 1 SNP in the EXOC2 gene reached the aimed significance level after correction for multiple comparisons (FDR) and was associated with a $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ value > 5.00 ng/ml, 11 SNPs located in the TYR (n=4), PRKACG (n=1), EDN1 (n=3), TYRP1 (n=1) and MITF (n=2) genes reached the aimed significance level after FDR correction and were associated with $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ values between 0.10 and 3.90 ng/ml. 9 SNPs in the DCT (n=1), TYRP1 (n=3), PRKAR2B (n=1), FGF2 (n=1), OCA2 (n=2) and EDN3 (n=1) genes did not reach the aimed significance level after FDR correction but were associated with $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ values > 5.00 ng/ml. In the linear regression model adjusted for sex, BMI, month of blood sample and year of birth, the following 3 SNPs showed a significance association with 25(OH)D values: rs2150097 (TYRP1), rs7356986 (EDN1) and rs12001326 (PRKACG). Next we analyzed the combined impact of relevant SNPs on the variation in 25(OH)D serum levels. The coefficients of determination (R^2) for the 12 significant SNPs and for the 46 SNPs identified by the first approach were 1.8 % and 5.6 %, respectively. Finally, we aimed to analyze the putative effect of SNPs on life expectancy in our cohort with patients at risk for CAD. Kaplan-Meier analysis and Cox Regression did not show an impact of individual SNPs on overall survival.

CONCLUSIONS: Variants of genes involved in skin pigmentation are predictive of serum 25(OH)D levels in the Caucasian population. Our data indicate that out of the variants in 29 different genes analyzed, variants of 11 genes, including EXOC2, TYR, TYRP1, OCA2 and DCT have the highest impact on vitamin D status. Our results have a fundamental importance to understand the role of sunlight, skin pigmentation and vitamin D for human evolution.

2. Einleitung

2.1. Bedeutung des Vitamin D für die menschliche Gesundheit

Die Identifizierung von genetischen Faktoren, welche den Vitamin D-Status des Menschen beeinflussen, wie z.B. die Hautpigmentierung, liefert wichtige Informationen über mögliche Ursachen des in der Bevölkerung weit verbreiteten Vitamin D-Mangels und über seine Risikogruppen.

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis über die Bedeutung des Vitamin D-Mangels als Risikofaktor für zahlreiche Erkrankungen wesentlich erweitert [16]. Entdeckt und bekannt wurde es durch seine Funktionen im Rahmen der Mineralisation und des Wachstums des Skeletts, und damit insbesondere auch durch seine entscheidende Rolle in der Pathogenese und Behandlung der Rachitis und der Osteomalazie [13, 16]. Diese Funktionen sind weiterhin sehr wichtig, werden aber insgesamt der Bedeutung des Vitamin D bei Weitem nicht gerecht. Denn mittlerweile wurden viele weitere Effekte auf zellulärer bzw. molekularer Ebene entschlüsselt. Dazu gehört beispielsweise die Stimulation der Proliferation und Differenzierung von Hautzellen oder Auswirkungen auf das Immunsystem [63]. Einige dieser Mechanismen bringen vielversprechende neue Erkenntnisse, aber auch Behandlungs- und Vorbeugungsmöglichkeiten für eine ganze Reihe von Erkrankungen mit sich, von denen einige im Folgenden kurz erläutern werden.

In mehreren Studien wurde die Wirkung auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die eine der häufigsten Todesursachen darstellt, untersucht. So konnte z.B. in einer Studie mit über 41.500 Patienten zum einen nachgewiesen werden, dass ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und dem Auftreten von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hypertonie, Hyperlipidämie und peripherer Gefäßerkrankung besteht [4]. Zum anderen besteht eine Assoziation zwischen dem Vitamin D-Status und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen wie koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Herzversagen, subklinischen Karotisstenosen und Schlaganfall [4, 12, 95]. Auch auf die kardiovaskuläre Mortalität insgesamt wurde eine günstige Wirkung eines ausreichenden Vitamin D-Status durch mehrere Studien, darunter die „Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health“ (LURIC-) Studie, deren Daten auch für diese Arbeit verwendet wurden, aufgezeigt [18, 100].

Wie oben schon kurz erwähnt, hat Vitamin D auch einen möglichen Einfluss auf Diabetes mellitus, nicht nur auf die Pathogenese von Typ II sondern auch auf Typ I. Es wurde festgestellt, dass Patienten, denen im Kindesalter Vitamin D zugeführt wurde, in späteren

Jahren seltener an Diabetes mellitus Typ I erkrankten [41]. Bei Typ II konnte nachgewiesen werden, dass ein Vitamin D-Mangel einen negativen Einfluss auf die Insulinproduktion und – Sekretion hat [60]. Hurst et al. zeigten zudem, dass niedrige Vitamin D-Spiegel mit einem erhöhtem Risiko für Diabetes Typ II zusammenhängen und dass eine Supplementierung eine bestehende Insulinresistenz vermindern kann [40].

Auch auf die Muskulatur wurden Auswirkungen nachgewiesen: In einer randomisierten, plazebokontrollierten Studie bei älteren Frauen zeigte sich zum einen, dass in der Gruppe, die ein Vitaminpräparat zu sich nahm, das Sturzrisiko und damit auch die Anzahl der Hüftfrakturen abnahm. Zum anderen kam es zu einer Erhöhung der Muskelkraft aufgrund einer Verdopplung der Typ- II-Muskelfasern, während die Typ I-Muskelfasern unverändert blieben [75].

Mittlerweile wurden auch antikanzerogene Wirkungen von Vitamin D in experimentellen Arbeiten festgestellt. Deeb et al. zeigten beispielsweise, dass Vitamin D antiproliferative, apoptoseaktivierende und angiogenesehemmende Eigenschaften besitzt [15]. Für diese in vitro Untersuchungen sprechen auch Ergebnisse weiterer Studien z.B. konnte in der Metanalyse von Gandini et al. festgestellt werden, dass zwischen dem Auftreten von kolorektalem Karzinom und dem 25(OH)D-Serumspiegel eine inverse Beziehung besteht [24]. Viele weitere Untersuchungen wurden zu diesem für die Medizin sehr bedeutenden Thema durchgeführt oder sind in Arbeit.

Auch aus anderen hier nicht aufgeführten Teilbereichen der Medizin gibt es mehr oder weniger eindeutige Hinweise auf Auswirkungen des Vitamin D. Dazu gehören beispielsweise Lungen- oder neurologische Krankheiten [7, 62].

Die hier aufgeführten Beispiele unterstreichen den großen Bedeutungsgewinn, den Vitamin D und seine Derivate in den letzten Jahren erfahren haben. Die Todesursachenstatistik der letzten Jahre in der Bundesrepublik Deutschland macht deutlich, dass die Mehrheit der deutschen Bevölkerung an Herz-Kreislauf-Erkrankungen gefolgt von bösartigen Neubildungen verstirbt [80]. Bei beidem handelt es sich wie oben beschrieben um Krankheiten, auf die das Vitamin D einen günstigen Einfluss haben kann. Dies hebt die Bedeutung der Vitamin-D-Forschung hervor und verleiht dieser ein gesamtgesellschaftliches Interesse [25]. Neben einem längeren Überleben durch Prävention und Therapie vieler Krankheiten sind dies nicht zuletzt auch gesundheitsökonomische Aspekte durch weniger Arbeitsausfälle und Belastungen des Gesundheitssystems, die hierbei eine wichtige Rolle spielen [25]. Dies alles sind Gründe, die die Notwendigkeit der genaueren Beschäftigung mit Vitamin D unterstreichen.

Die Wichtigkeit des genauen Verständnisses des Vitamin D wird deutlich, wenn man die Versorgungslage der Bevölkerung betrachtet: In einer Studie von Hintzpeter et al. zeigte sich, dass in den sonnenreichen Monaten (Mai bis Oktober) 45,2 % aller Männer und 54,8 % aller Frauen in der Bundesrepublik Deutschland einen 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel von 50 nmol/L oder darunter aufwiesen [30]. Wenn man wie in Tabelle 1 aufgelistet berücksichtigt, dass unterhalb von 50 nmol/L von einem Vitamin D-Mangel auszugehen ist, kann somit festgehalten werden, dass bei einem sehr großen Anteil der deutschen Bevölkerung ein Vitamin D-Mangel vorliegt. Hinzu kommt noch, dass teilweise in der Literatur der Wert 50 nmol/L mittlerweile bereits als zu niedrig angesehen wird und von einigen Autoren Werte im Bereich von über 75 nmol/L empfohlen werden [37].

schwerer Mangel	mäßiger Mangel	leichter Mangel	optimal
<12 nmol/L	12,5 - 25 nmol/l	25-50 nmol/L	> 50 nmol/L

Tabelle 1: 25(OH)D-Mangel nach [30]

Eine andere Einteilung des Vitamin D-Mangels nimmt eine Unterscheidung zwischen Vitamin D-Defizienz und -Insuffizienz vor (Tabelle 2) [37].

Defizienz	Insuffizienz
< 50 nmol/L	51-74 nmol/L
< 20 ng/ml	21 - 29 ng/ml

Tabelle 2: 25(OH)D-Defizienz und -Insuffizienz nach [37]

Sowohl diese beschriebene, sehr ausgeprägte Mangelsituation, als auch die oben aufgeführten Erkenntnisse der letzten Jahre, zeigen wie wichtig es für die Medizin und Biologie ist sich mit Vitamin D genauer zu beschäftigen.

2.2. Der Vitamin D-Stoffwechsel des Menschen und Faktoren, die den Vitamin D-Status beeinflussen

Als Basis für alle tiefergehenden Fragestellungen ist es notwendig, sich zunächst einen Überblick über die Grundlagen des Vitamin D zu verschaffen: Angefangen bei seinen Eigenschaften bis hin zu den komplexen Stoffwechselwegen. Diese Überlegungen münden letztlich in der wichtigen Frage welche Faktoren den Vitamin D-Spiegel im Blut beeinflussen. In dieser Arbeit soll schließlich ein wichtiger Faktor – die Hautpigmentierung – genauer behandelt und untersucht werden.

Vitamin D und seine Metaboliten sind eine Gruppe von Stoffen, die zu den Steroiden gezählt werden können und somit lipophile Eigenschaften besitzen [54, 57]. Vitamin D kann als Vitamin D₃ (Cholecalciferol) oder Vitamin D₂ (Ergocalciferol) vorliegen [13]. Diese beiden Moleküle ähneln sich zwar, zeigen aber dennoch einige Unterschiede in ihrer Strukturformel auf [57]. Vitamin D₃ hat eine molare Masse von $384,64 \frac{g}{mol}$, während Vitamin D₂ eine molare Masse von $396,65 \frac{g}{mol}$ aufweist [50].

Allgemein sind Vitamine als Stoffe definiert, die Pflanzen und Mikroorganismen oft selbst produzieren können, hingegen höhere Lebensformen diese Eigenschaft im Laufe der Evolution verloren haben, weshalb diese Stoffe zu essentiellen Nahrungsbestandteilen geworden sind [57]. Das Vorläufermolekül von Vitamin D₂ ist Provitamin D₂ (Ergosterol), das durch Photolyse in Prävitamin D₂ und schließlich zu Vitamin D₂ reagiert [38]. Da nur Pflanzen und Pilze in ihren Zellmembranen Ergosterol besitzen, sind auch nur sie in der Lage Vitamin D₂ zu bilden [13]. Das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D setzt sich zum einen aus D₂-Anteilen, das aus pflanzlichen Nahrungsbestandteilen und Pilzen stammt, und zum anderen aus D₃-Anteilen aus tierischen Produkten zusammen [96]. Allerdings deckt der mit der Nahrung aufgenommene Anteil des Vitamin D nur ca. 5 – 10 % des gesamten menschlichen Bedarfs an Vitamin D ab [96]. Der Rest, also ca. 90 - 95 %, wird in der menschlichen Haut synthetisiert [96]. Da Vertebraten wie der Mensch kein Ergosterol in ihrer Zellmembran besitzen, handelt es sich beim selbst synthetisierten Anteil ausschließlich um Vitamin D₃-Formen [13]. D₃ kann also sowohl mit der Nahrung aufgenommen als auch im menschlichen Organismus selbst hergestellt werden, während Vitamin D₂ ausschließlich aus der Nahrung stammt [96].

Da Vitamin D₃ im Gegensatz zu den klassischen Vitaminen zum überwiegenden Anteil im Körper selbst synthetisiert werden kann und es somit kein essentieller Nahrungsbestandteil

ist, verdeutlicht eine gewisse Fehlbezeichnung des Vitamin D [66]. Es handelt sich bei Vitamin D vielmehr um ein körpereigenes Hormon als um ein Vitamin [66].

Da der menschliche Körper in der Lage ist das Vitamin D zum überwiegenden Teil selbst herzustellen, waren die Menschen nie darauf angewiesen den Vitamin D-Bedarf vollständig über die Nahrung zu decken [38]. Der wahrscheinlichste Grund, dass von Natur aus die körpereigene Synthese im Vordergrund steht, ist der, dass die gängigen Lebensmittel nur wenig Vitamin D pro Gewicht enthalten [38, 96]. Auch die Ernährungsgewohnheiten der meisten Menschen in heutiger Zeit lassen keine höhere Zufuhr von Vitamin D über die Nahrung zu [96]. Dies spiegelt sich in epidemiologischen Zahlen der Nationalen Verzehrstudie von 2012 wieder. Darin wurde festgestellt, dass 82 % der Männer und 91 % der Frauen die empfohlene tägliche Zufuhr unterschreiten [11]. Um den Vitamin D-Bedarf zu decken, ist der überwiegende Anteil der Bevölkerung also auf die körpereigene Synthese angewiesen.

Aber nicht nur der niedrige Vitamin D-Gehalt der Lebensmittel stellt einen limitierenden Faktor dar, sondern auch intestinale Fett-Malassimilationssyndrome [38, 71]. Dazu gehören Maldigestion (durch verminderte Aktivität pankreatischer Verdauungsenzyme oder durch verminderte luminale Gallensäurekonzentration), Malabsorption (z. B. durch Morbus Crohn oder durch das Kurzdarm-Syndrom) und die lymphatische Obstruktion, die verhindert, dass die Chylomikronen aufgenommen werden können [71, 21]. Klapdor et al. konnten zeigen, dass bei 91 % von Patienten mit Pankreaserkrankungen erniedrigte Vitamin D-Spiegel vorlagen [43]. Ähnliches wurde von Farraye et al. bei Morbus Crohn gefunden. Hier hatten mehr als 70 % der Patienten mit Morbus Crohn einen defizitären oder insuffizienten Vitamin D-Status [21].

Die genannten Erkrankungen und die Tatsache, dass die mit der Nahrung zugeführte Menge nur ca. 5 - 10 % beträgt, erklären noch nicht allein warum ein so großer Teil der Bevölkerung an Vitamin D-Mangel leidet. Folglich müssen wichtige Gründe für die Mangelsituation auch in der körpereigenen Synthese selbst und in den dazu notwendigen Voraussetzungen verborgen liegen, deren genauere Betrachtung einige Antworten liefern.

Die Biosynthese von Vitamin D läuft über mehrere Zwischenprodukte ab, von denen die wichtigsten in Tabelle 3 mit ihren verschiedenen Bezeichnungen aufgelistet sind.

Stoff	Synonyme	Abkürzung
Provitamin D ₃	7-Dehydrocholesterin	7-DHC
Prävitamin D ₃	s-cis, s-cis Prävitamin D ₃	
Vitamin D ₃	Cholecalciferol/Calciol	
Provitamin D ₂	Ergosterol	
Vitamin D ₂	Ergocalciferol	
25-Hydroxyvitamin D	Calcidiol	25(OH)D
1,25-Dihydroxyvitamin D	Calcitriol	1,25(OH) ₂ D
Calcitronsäure		1,24,25(OH) ₃ D

Tabelle 3: Übersicht über wichtige Vitamin D-Derivate nach [13, 38]

Ausgangssubstrat der Vitamin D-Synthese ist 7-DHC in menschlichen Hautzellen [50]. Das Cholesterinderivat 7-DHC wird im Rahmen der Cholesterinbiosynthese in einem mehrstufigen Reaktionsprozess in den Hautzellen aus Acetyl-CoA gebildet [50, 56]. Acetyl-CoA entsteht beim Abbau von Kohlenhydraten, der β -Oxidation von Fettsäuren und beim Abbau einiger Aminosäuren [55]. Die Synthese von Cholesterin läuft zunächst im Zytosol ab, später im Endoplasmatischen Retikulum [56]. Cholesterin ist ein körpereigenes Lipid, das als Grundgerüst das Steran aufweist und Ausgangsstoff vieler weiterer Reaktionen sein kann, wie z.B. die Synthese von Steroidhormonen, Gallensäuren und Zellmembranen [54, 56]. In der Haut steht Cholesterin in einem biochemischen Gleichgewicht mit 7-Dehydrocholesterin, das auch als Provitamin D₃ oder kurz als 7-DHC bezeichnet wird [50]. Dieses Gleichgewicht wird durch das Enzym 7-DHC- Δ^7 -Reduktase aufrechterhalten [50]. 7-DHC befindet sich in den Lipiddoppelmembranen aller Hautzellen, wobei die Konzentration nicht in allen Schichten gleich hoch ist: 35 % des 7-DHC befinden sich in der Dermis, 65 % in der Epidermis – hier wiederum der größte Anteil im Stratum basale sowie im Stratum spinosum [13, 32].

Bei der nun folgenden Reaktion wird bei dem 7-DHC-Molekül der B-Ring der Steran-Struktur mittels UV-Strahlen des Sonnenlichts zwischen den Atomen C9 und C10 aufgespalten, ein Vorgang der auch für die Fragestellung dieser Arbeit von großer Wichtigkeit ist [13].

Eine solche Reaktion wird als photochemische Umwandlung oder Photolyse bezeichnet [50]. Wenn das 7-DHC-Molekül UV-Photonen absorbiert, wird es in Prävitamin D₃ umgewandelt [13].

Bei dessen Bildung kommt es zu veränderten hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen mit den Fettsäuren der Zellmembran, sodass das spätere Vitamin D in den Extrazellularraum entlassen werden kann [13]. Da Prävitamin D₃ energetisch instabil ist, reagiert es über eine thermische Isomerisierungsreaktion weiter zu Vitamin D₃ [13].

UV-Licht ist somit eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf der beschriebenen Photolyse. Licht allgemein kann zum einen als elektromagnetische Welle angesehen werden [28]. Wie alle elektromagnetischen Wellen besitzt Licht die konstante Ausbreitungsgeschwindigkeit von $c = 299.792.459 \frac{m}{s}$ (Lichtgeschwindigkeit) und kann mit Hilfe der Wellenlänge und Frequenz durch folgende Gleichung (1) beschrieben werden [28].

$$(1) \quad c = \lambda \cdot f$$

(c: Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle; f: Frequenz; λ : Wellenlänge)

Nach dem Wellen-Teilchen-Dualismus hat Licht zum anderen aber auch Teilcheneigenschaften [28]. Diese Lichtteilchen oder „Quanten“ werden als Photonen bezeichnet [28]. Die beschriebene Photolyse von 7-DHC ist davon abhängig, wie viele Photonen mit welcher Energie die einzelnen Hautschichten erreichen. Das Maximum der Wellenlänge des Sonnenlichts, die zur Photolyse führt, liegt im Bereich der UVB-Strahlung, also etwa im Wellenlängenbereich zwischen 290 bis 310 nm [13].

Die Quantenenergie kann mit folgender Gleichung (2) berechnet werden [28].

$$(2) \quad E = h \cdot f$$

(E: Energie, h: Plancksches Wirkungsquantum)

Setzt man die nach der Frequenz umgeformte Gleichung 1 in Gleichung 2 ein, so erhält man Gleichung 3:

$$(3) \quad E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Daraus ist ersichtlich, dass die Energie eines Photons im umgekehrt proportionalen Verhältnis zu seiner Wellenlänge steht. Folglich nimmt mit zunehmender Wellenlänge (also außerhalb des UVB-Bereichs) die Energie der UV-Strahlung ab, woraus eine geringere Photolyse von 7-DHC resultiert [50].

Desweiteren werden bei längerer Sonnenexposition, aber auch bei zu hohen Wellenlängen Nebenprodukte von Prävitamin D₃ gebildet: Bei UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von >300 nm wird Prävitamin D₃ reversibel in seine Photosiomere Tachysterol₃ und Lumisterol₃ umgewandelt und schließlich irreversibel in Toxisterole [13, 50]. Dieser Effekt wird als

photochemische Regulation bezeichnet, die eine übermäßige Vitamin D-Produktion und damit die Entstehung einer Intoxikation über die kutane Synthese verhindert [33, 34].

Neben Prävitamin D₃ wird auch Vitamin D₃ bei zunehmender Wellenlänge irreversibel umgewandelt [50]: Wenn das gebildete Vitamin D₃ vor der Abgabe an die Blutzirkulation weiterhin Sonnenlicht ausgesetzt wird, kommt es zu einer sogenannten Photodegradation [92]. Vitamin D₃ absorbiert dabei UV-Strahlung und wird im Wesentlichen zu drei Produkten photolysiert: 5,6-*trans*-Vitamin D₃, Suprasterol 1 und Suprasterol 2 [13, 92]. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass die anfangs vorhandenen Vitamin D₃-Menge bereits nach zehnminütiger Sonnenexposition in Boston im Sommer um bis zu 30 % abgenommen hat, nach 3 Stunden waren schon 95 % photodegradiert. Die Photodegradation fand sogar im Winter statt, obwohl zu dieser Zeit keine Photolyse von 7-DHC möglich ist [13, 92].

Die Photolyse von 7-DHC zu Vitamin D₃ ist nicht nur von der Wellenlänge, sondern auch von vielen weiteren Faktoren abhängig. Holick et al. zeigten, dass in Boston, das im US-Bundesstaat Massachusetts auf dem 42. nördlichen Breitengrad liegt, die Vitamin D₃-Produktion nur zwischen März und November stattfindet [36]. Zusätzlich wurde eine tageszeitliche Abhängigkeit festgestellt: im Juli beginnt die Photosynthese zwischen 9 und 10 Uhr am Morgen und endet gegen 18 Uhr am Abend, also deutlich nach Sonnenaufgang bzw. vor Sonnenuntergang [36]. Im Gegensatz zu Boston läuft die Vitamin D₃-Produktion im norwegischen Bergen, das um 18° nördlicher als Boston liegt, nur in einem Zeitraum von April bis Oktober ab [36]. Auch die Dauer der Synthese pro Tag ist im Vergleich zu Boston vermindert: im Juli findet sie nur zwischen 11 Uhr und 18 Uhr statt [36]. Diese Abhängigkeit sowohl vom Breitengrad als auch von der Jahres- und Tageszeit wird dadurch erklärt, dass der Weg der UVB-Photonen in der Atmosphäre in den Wintermonaten in höheren Breitengraden sowie in den Morgen- und Abendstunden verlängert ist und dadurch mehr Photonen von Ozonmolekülen in der Stratosphäre absorbiert werden [13, 36]. Neben diesen geographischen Abhängigkeiten konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Vitamin D₃-Produktion auch durch Wolken und Aerosole in der Luft vermindert werden kann [19].

Desweiteren haben auch Faktoren, die die Haut vor Sonnenlicht abschirmen, wie z. B. Sonnencremes und Kleidung, Auswirkungen auf den Vitamin D₃-Haushalt [20, 61]. Die Aufgabe von Sonnenschutzmittel besteht darin, die Haut vor zu intensiver UV-Strahlung zu schützen und damit insbesondere Hautkrebs vorzubeugen, aber auch eine frühzeitige Hautalterung und Photodermatosen zu verhindern [59]. Durch diesen Schutzeffekt wird jedoch auch der positive Effekt der UVB-Strahlung, nämlich die Vitamin D₃-Produktion, herabgesetzt. So konnte Matsuoka et al. nachweisen, dass Personen, die ein

Sonnenschutzmittel verwendet haben, eine signifikant niedrigere 25(OH)D-Konzentration aufwiesen [61]. Auch wenn die Haut durch Kleidung beispielsweise durch das Tragen von Schleiern abgeschirmt wird, kann daraus ein Vitamin D₃-Mangel resultieren. Erkal et al. stellten fest, dass 30 % der in Deutschland lebenden türkischen Frauen an einem schweren Vitamin D-Mangel leiden, während im Vergleich dazu nur 8 % der türkischen Männer davon betroffen sind [20].

Aber nicht nur äußere Bedingungen beeinflussen die Menge der wirksamen UVB-Strahlung, sondern auch eine Vielzahl dermatologischer Faktoren. Alexander Wunsch zählt in seinem Artikel „Zur biologischen Wirkung von Sonnenlicht“ die beteiligten anatomischen, histologischen und physiologischen Faktoren auf, die Teil der natürlichen Lichtschutzreaktion der Haut sind [97]:

Nachdem die Haut der Sonne ausgesetzt wird, vermehrt sich das oberflächliche Kapillarnetz [97]. Dies führt dazu, dass aufgrund der vermehrten Durchblutung auch eine höhere Konzentration von Hämoglobin vorliegt [97]. Hämoglobin ist in der Lage UV-Strahlung sehr gut zu absorbieren und kann somit tiefere Schichten vor den negativen Folgen der Strahlung schützen [97]. Dieses Phänomen wird als Wärme-Erythem bezeichnet, das nach der Beendigung der Lichtexposition jedoch rasch wieder verschwindet [97]. Nach diesem Wärme-Erythem bildet sich ein länger wirksames UV-Erythem aus, das durch die Freisetzung von Histamin, welches vasodilatatorisch wirkt, zustande kommt [97].

Desweiteren führt UVB-Strahlung zu einer Stimulation der Hautkeimzellschicht, wodurch vermehrt Keratinozyten und Korneozyten gebildet werden [97]. Diese Zellvermehrung wird als Lichtschwiele bezeichnet [97]. Aufgrund dieser Lichtschwiele erhöht sich die Konzentration des strahlungsprotektiven Keratins [97]. Keratin bildet eine Schutzschicht über den darunterliegenden strahlungsempfindlichen Zellen [97]. Auch die Urocaninsäure, die sich im menschlichen Schweiß befindet, hat einen ähnlichen Effekt: Durch UV-Strahlung größer als 290 nm wird die ursprüngliche Form (trans-Urocaninsäure) zu cis-Urocaninsäure photoisomerisiert [48, 97].

Die Proliferation im Rahmen der Ausbildung der Lichtschwiele führt noch zum folgenden Schutzmechanismus. Da Korneozyten keinen Zellkern und DNS als Speicherort der genetischen Information mehr benötigen, kommt der DNS eine neue Funktion zu: DNS-Moleküle sind in der Lage die schädliche UV-Strahlung in Wärme umzuwandeln [97]. Auch weitere Moleküle können insbesondere in tieferen Hautschichten Photonen des UV-Lichts absorbieren: Dazu gehören Melanin, RNS, Proteine, Lipide und Karotenoide [13, 23].

Außerdem beschreibt Wunsch als weitere Faktoren des natürlichen Hautschutzes vor UV-Strahlung u.a. die Behaarung der Haut, Schweiß, hormonelle Reaktionen und als einer der wichtigsten Faktoren von allen die Hautpigmentierung, auf die später noch genauer eingegangen wird, da dieser Schutzmechanismus von zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist [97]. Diese genannten Faktoren reduzieren zwar als natürlichen Schutz der Haut die einfallende UV-Strahlung, aber ob und in wie weit davon allerdings die Photolyse von 7-DHC und damit die Vitamin D₃-Produktion beeinflusst werden kann, ist bis auf die Hautpigmentierung noch nicht geklärt.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der einen Einfluss auf die Vitamin D₃-Synthese in der Haut besitzt, ist das Lebensalter. So konnte z. B. Lester et al zeigen, dass nicht an das Haus gebundene ältere Personen zwischen 70 und 88 Jahren niedrigere 25(OH)D-Spiegel aufwiesen im Vergleich zu gesunden jüngeren Personen [51]. MacLaughlin und Holick stellten fest, dass die Konzentration von 7-DHC bei Älteren in der Epidermis absinkt, insbesondere im Stratum basale, das die Hauptquelle des Vitamin D₃ in der Haut darstellt [58]. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass das Altern die Kapazität der Haut Vitamin D₃ zu produzieren herabsetzt [13]. Eine Erklärung wird u. a. darin gesehen, dass mit zunehmendem Alter die Hautdicke abnimmt [84].

Holick et al. brachten 1981 die drei wichtigsten Faktoren, die die dermale Produktion von Vitamin D₃ begrenzen, in eine Reihenfolge: Die photochemische Regulation, also die Bildung von Lumisterol₃ und Tachysterol₃, hat den größten begrenzenden Effekt, gefolgt von der Hautpigmentierung und dem Breitengrad [33].

Nach der Photolyse wird Vitamin D₃ in die Blutzirkulation ausgeschleust und muss als lipophiler Stoff an Transportproteine, die es überwiegend zur Leber transportieren, gebunden werden [38, 50]. Zu diesen gehört das DBP (= Vitamin D bindende Protein oder GC (= gruppenspezifische Komponente)-Globulin) aber auch Albumin [50, 91]. Bei DBP handelt es sich um ein 52-59 kDa großes Plasmaprotein, das in der Leber produziert wird [91]. Die Bindungsaffinität von Vitamin D₂ an DBP ist allerdings schlechter als die von Vitamin D₃, woraus eine geringere Plasma-Halbwertszeit und eine geringere Aktivität resultieren [50]. Über die Nahrung aufgenommenes Vitamin D wird über Chylomikronen durch das lymphatische System in die venöse Blutzirkulation transportiert [38].

Ein Teil des Vitamin D wird im Fettgewebe eingelagert, von wo aus es bei Bedarf wieder freigesetzt werden kann [50]. Dies führt, wie in mehreren Studien nachgewiesen wurde, aber dazu, dass ein höherer Body-Mass-Index (BMI) mit niedrigeren 25(OH)D-

Serumkonzentrationen einhergeht [2]. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhaltes wird darin gesehen, dass dem Vitamin D mit steigendem BMI auch ein größeres Verteilungsvolumen zur Verfügung steht [90].

In der Leber läuft der nächste Schritt der Synthese ab. Da mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₂ über analoge Reaktionen ebenfalls in seine aktiven Metaboliten überführt wird, wird im Folgenden allgemein nur von Vitamin D-Formen gesprochen.

In der Leber wird Vitamin D (also D₃ und D₂) überwiegend durch das mikrosomale Enzym CYP2R1 am C-25-Atom hydroxyliert [78, 88]. CYP2R1 gehört zur großen Enzymfamilie der Monooxygenasen, die überwiegend im glatten Endoplasmatischen Retikulum von Leber und Niere zu finden sind [8]. Diese Enzyme enthalten als zentrale Gruppe Cytochrom P₄₅₀ (=CYP), das wiederum ein Hämzentrum mit einem Fe³⁺-Ion besitzt [8, 88]. Bei den von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen wird eines der beiden Sauerstoffatome des O₂-Moleküls in Form einer Hydroxylgruppe (-OH) an das Substrat angefügt [8]. Auf das verbleibende Sauerstoffatom werden während dieser Reaktion zwei Elektronen und zwei Protonen übertragen, sodass dieses O-Atom zu Wasser weiterreagiert [8]. Elektronendonator ist dabei meist NADPH/H⁺ [8].

Eine strikte Regulation von CYP2R1 ist bislang noch nicht bekannt [50]. Das entstandene Produkt wird als 25-Hydroxy-Vitamin D, 25(OH)D oder Calcidiol bezeichnet [90]. 25(OH)D wird nach seiner Bildung in den Blutkreislauf abgegeben und relativ fest an DBP gebunden [50].

Da die Leber im Vitamin D-Stoffwechsel eine wichtige Funktion übernimmt, sowohl in der Produktion von DBP, als auch in der 25-Hydroxylierung, konnte nachgewiesen werden, dass ein Zusammenhang von chronischen Lebererkrankungen mit niedrigen 25(OH)D-Serumkonzentrationen besteht [68]. Die Gründe weshalb Patienten mit chronischen Lebererkrankungen wie z. B. Leberzirrhose erniedrigte Vitamin D-Spiegel haben, werden darin gesehen, dass diese Patienten sich weniger in der Sonne aufhalten, sich ungenügend ernähren, Vitamin D ungenügend resorbiert werden kann und es zu einer insuffizienten 25-Hydroxylierung kommen kann [34, 68].

Der von der Leber in den Blutkreislauf abgegebene Komplex aus DBP und 25(OH)D wird in den Glomeruli der Niere abfiltriert [65]. Die proximalen Tubulusepithelzellen der Nieren besitzen in ihrer luminalen Membran den Megalin-/Cubulin-Rezeptor aus der Familie der LDL- Rezeptoren [65]. Der DBP x 25(OH)D-Komplex bindet als Ligand an diesen Rezeptor und wird über Endozytose in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen [65]. Intrazellulär wird 25(OH)D schließlich durch Peptidasen aus dem Komplex mit DBP freigesetzt [50].

Innerhalb den Nierenzellen wird das 25(OH)D-Molekül durch das Enzym CYP27B1 (1 α -Hydroxylase) an der C-1 α -Position hydroxyliert [50, 88]. Das entstandene Reaktionsprodukt ist 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D und wird auch als Calcitriol oder kurz als 1 α ,25(OH)₂D bzw. 1,25(OH)₂D bezeichnet [50]. Das CYP27B1-Enzym unterliegt einer strengen Regulation: Bindet 1,25(OH)₂D an seinen Rezeptor VDR, wird die Gentranskription von CYP27B1 herabgesetzt [26, 57]. Ebenfalls wichtige hemmende Stoffe sind der Fibroblasten-Growth-Faktor 23 (FGF-23), sowie hohe Phosphat- und Calciumserumspiegel [57, 77]. Bei Calcium funktioniert dies dahingehend, dass durch hohe Ca²⁺-Konzentrationen über ein heptahelicales Sensorprotein die intrazelluläre cAMP-Konzentration verringert wird, was die Aktivität von CYP27B1 herabsetzt [57]. Umgekehrt führen eine Hypokalzämie und eine Hypophosphatämie zu einer Aktivitätszunahme der 1 α -Hydroxylase [26]. Parathormon (PTH), das bei niedrigen Ca²⁺-Serumspiegel von den Epithelkörperchen (Nebenschilddrüse) sezerniert wird, steigert über einen PTH-Rezeptor die cAMP-Konzentration, woraus eine verstärkte Aktivierung des CYP27B1- Enzyms resultiert [57].

Da der Niere somit eine entscheidende Bedeutung in der Calcitriolsynthese zukommt, ist bei Patienten, die an einer chronischen Niereninsuffizienz leiden, häufig auch ein Vitamin D-Mangel zu finden [47]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den proximalen Tubuluszellen der Nieren sowohl der Gehalt von CYP27B1 als auch der Gehalt des für die Endozytose des DBP \times 25(OH)D-Komplexes wichtigen Megalins mit zunehmender Niereninsuffizienz abnimmt, was zu einer verminderten Synthese von 1,25(OH)₂D führt [47]. Den gleichen Effekt hat auch die zunehmende Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), da damit auch weniger 25(OH)D in den Primärharn abfiltriert werden kann und dadurch auch weniger 25(OH)D zur Hydroxylierung in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen werden kann [47].

Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion haben neben einer verminderten 1,25(OH)₂D-Konzentrationen häufig auch erniedrigte 25(OH)D-Spiegel [5, 46]. Die Ursache dafür wird in der verminderten Sonnenexposition und Malnutrition gesehen [5]. Dies belegt z.B. eine Studie von Krause et al., in der über einen Zeitraum von neun Jahren bei über 25.000 Patienten regelmäßig der Vitamin D-Status bestimmt wurde [46]. Dabei zeigte sich, dass 16,2 % der Patienten einen 25(OH)D-Spiegel von unter 30 μ g/L aufwiesen, 72,8 % sogar Werte von unter 20 μ g/L [46].

Renal gebildetes 1,25(OH)₂D wird nach seiner Bildung analog zu 25(OH)D an DBP im Blut transportiert und gelangt so zu seinen Zielorganen [50]. Die Zellen der Zielorgane nehmen den Komplex aus DBP und 1,25(OH)₂D über Endozytose auf [50]. Innerhalb der Zellen

bindet $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ an den Vitamin D-Rezeptor (VDR), wodurch eine Vielzahl von genomischen Effekten beeinflusst werden kann [57]. Der VDR ist ein im Zellkern befindlicher Rezeptor (nukleärer Rezeptor), der nach seiner Aktivierung als Heterodimer mit einem Retinsäurerezeptor des Typs RXR an eine bestimmte Erkennungssequenz der DNS bindet [57]. Dadurch kann die Transkription bestimmter Gene vermehrt oder vermindert werden [57]. Untersuchungen zeigen, dass 5-10 % aller menschlichen Gene, also über 3.000 Gene, durch Vitamin D regulatorisch beeinflusst werden können [57, 63].

Im Dünndarm induziert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Bildung eines elektrogenen Calciumkanals an der apikalen (luminalen) Membran der Enterozyten, die Bildung eines intrazellulären calciumbindenden Proteins, das sogenannte Calbindin (Calbinin 9K), und die Bildung einer Calcium-ATPase an der basolateralen Seite der Dünndarmzellen [57, 38]. Dadurch wird die intestinale Ca^{2+} -Resorption gesteigert [57, 38]. Auch die Phosphatreabsorption im Dünndarm wird – wahrscheinlich durch die gesteigerte Expression eines Na^+/P_i -Symporters – erhöht [57].

In der Niere wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sowohl die Calcium- als auch die Phosphatreabsorption aus dem Ultrafiltrat des Tubulussystems erhöht [57].

Wird der VDR innerhalb der Osteoblasten durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aktiviert, wird die Expression des NF κ B-Ligand (RANKL) gesteigert [38]. RANKL ist ein Protein der Osteoblastenmembran [38]. Dieses Protein bindet und aktiviert RANK, einen Rezeptor auf der Membran von Präosteoklasten, die dadurch zu Osteoklasten ausreifen [38]. Osteoklasten halten den Calcium- und Phosphatblutspiegel aufrecht, indem sie die entsprechenden Ionen aus dem Knochen entfernen [38]. Ausreichend hohe Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Spiegel sind Voraussetzung für eine gute Knochenmineralisierung [38]. Zudem werden in Osteoblasten Proteine wie Osteocalcin oder Osteopontin induziert, die für den Knochenmatrixaufbau und die Calcifizierung wichtig sind, sodass insgesamt die mineralisierende Wirkung auf den Knochen überwiegt [57].

Ein wichtiges Krankheitsbild der kalzämischen Organe ist die Osteomalazie bzw. die Rachitis [72]. Bei der Osteomalazie handelt es sich um eine ungenügende Mineralisierung des Osteoids mit verminderter Einlagerung von Calcium und Phosphat nach Abschluss des Knochenwachstums [72]. Klinische Symptome können diffuse Knochenschmerzen, Muskelschwäche mit Gangunsicherheit und in seltenen Fällen auch Knochenverformungen sein [72]. Hingegen spricht man beim kindlichen Skelett, d.h. vor Wachstumsfugenschluss, von einer Rachitis [72]. Die Folgen hierbei sind Skelettverformungen (v.a. verdickte epiphysäre Wachstumszonen und evtl. gebogene Röhrenknochen), Frakturanfälligkeit,

Muskelschwäche und Wachstumsstörungen [72]. Hervorgerufen werden diese beiden Erkrankungen entweder durch Vitamin D-Mangel oder durch schweren Calcium- oder Phosphatmangel, was dazu führt, dass primär gebildete Matrixsubstanz in den Knochen (Osteoid) nur ungenügend mineralisiert wird [72]. Die Folgen sind verbreiterte Osteoidsäume und aufgrund der ungenügenden Mineralisierung Anfälligkeit für Verformungen und Frakturen [72].

Die Wirkung auf nichtkalzämische Organe und Gewebe mit ihren vielfältigen klinischen Bedeutungen wurde anfangs bereits erwähnt.

Neben dem beschriebenen Weg der Vitamin D-Biosynthese über Haut, Leber und Nieren, kann $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auch in einigen extrarenalen Geweben gebildet werden [50]. Dies ist nur möglich, da diese Zellen analog zu Nierenzellen ebenfalls über das Enzym CYP27B1 verfügen, das am C-1-Atom des $25(\text{OH})\text{D}$ -Moleküls eine OH-Gruppe anfügen kann [50]. Dazu gehören Zellen der Prostata, Brustdrüse, Lunge, Darm, Plazenta, Immunsystem und Keratinozyten [50].

Extrarenal gebildetes $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ wirkt lokal an seinem Bildungsort, d.h. es wird nicht in die Zirkulation abgeben und hat somit keinen Einfluss auf den Kalziumstoffwechsel [38]. Einige Zellarten wie Keratinozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, epitheliale Prostatazellen und Osteoblasten verfügen neben der schon genannten CYP27B1 auch über Enzyme mit 25-Hydroxylaseaktivität (CYP2R1 und CYP27A1) [50].

Bei einem Vergleich der biologischen Aktivitäten von $25(\text{OH})\text{D}$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ergibt sich, dass die Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bis zu 1.000 - mal höher ist [50]. Allerdings muss beachtet werden, dass die Serumkonzentration von $25(\text{OH})\text{D}$ ca. 1.000-mal höher ist als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [50]. Die Halbwertszeit von $25(\text{OH})\text{D}$ beträgt 2-3 Wochen, während die HWZ von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bei nur ca. 4 Stunden liegt, was dazu führt, dass es bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu großen Schwankungen kommen kann [31]. Während in der Niere gebildetes $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ hauptsächlich an der Regulation des Knochenkalziumspiegels beteiligt ist, ist extrarenal gebildetes Vitamin D für die anderen genannten Funktionen (wie z.B. Krebsprävention) von Bedeutung [31]. Die Niere ist auch noch bei niedrigen $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumspiegel in der Lage genug $25(\text{OH})\text{D}$ für eine ausreichende Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aus dem Blut zu ziehen, während die extrarenalen Zellen schon einen Mangel an Vitamin D aufweisen [31]. Deshalb kann es vorkommen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ noch im Normbereich liegt oder sogar niedrig erhöht sein kann und Knochen- und Kalziumstoffwechsel unauffällig sind, aber dennoch ein Mangel an $25(\text{OH})\text{D}$ vorhanden ist [31]. Aus diesen Gründen wird der Serumspiegel von $25(\text{OH})\text{D}$ als der beste Parameter angesehen den Vitamin D-Status einer Person zu bestimmen [31, 38].

Abgebaut werden die Vitamin D-Formen durch das Enzym CYP24A1, das eine 24-Hydroxylaseaktivität besitzt [38]. CYP24A1 kann sowohl 25(OH)D als auch 1,25(OH)₂D an der C-24-Position hydroxylieren, wodurch die biologisch inaktiven Formen 25,24(OH)₂D bzw. 1 α ,24,25(OH)₃D entstehen [63, 34]. Diese Moleküle sind aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe wasserlöslicher und können dadurch besser ausgeschieden werden [34]. 1 α ,24,25(OH)₃D wird auch als Calcitronsäure bezeichnet und über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden [34]. Reguliert wird der Abbau durch 1,25(OH)₂D selbst: Bindet Calcitriol an seinen Rezeptor VDR, wird die Gentranskription von CYP24A1 gesteigert [26]. Auch einige Medikamente wie z.B. Carbamazepin, Phenobarbital, Phenytoin und Primidon können über den Pregnan-X-Rezeptor (PXR), der in seinem DNS-Bindungsverhalten Ähnlichkeiten mit dem VDR aufweist, die Genexpression von CYP24A1 erhöhen [26]. Eine Hyperkalzämie steigert ebenfalls die Aktivität von CYP24A1 [26].

Eine weitere wichtige Ursache eines Vitamin D-Mangels kann z.B. die sogenannte tumor-induzierte Osteomalazie (TIO) sein [34]. Tumorzellen sezernieren dabei zum einen FGF23, das die CYP27B1-Enzymaktivität vermindert, zum anderen analog zum FGF23 wirkende Hormone, die unter dem Begriff der Phosphatonine zusammengefasst werden [34].

Ein primärer Hyperparathyreoidismus (pHPT) führt zu erniedrigten 25(OH)D-Werten bei gleichzeitig erhöhten 1,25(OH)₂D-Spiegeln [34]. Ursache kann ein solitäres Adenom, eine Hyperplasie der Nebenschilddrüsen oder ein Nebenschilddrüsenkarzinom sein [72]. Wahrscheinlich kommt es aufgrund einer gestörten Ca²⁺-Sensitivität der Nebenschilddrüsenzellen zu einer nicht-supprimierbaren Parathormon-Erhöhung und damit zu einer Hyperkalzämie [72]. Durch den erhöhten PTH-Spiegel im Blut wird wie weiter oben beschrieben vermehrt 25(OH)D zu 1,25(OH)₂D umgebaut [72].

Auch bei granulomatösen Erkrankungen wie z.B. Sarkoidose, Tuberkulose und einigen Lymphomen können Konstellationen ähnlich einer pHPT auftreten: erniedrigte 25(OH)D-Werten bei gleichzeitig erhöhten 1,25(OH)₂D-Spiegeln [34]. Dies kommt dadurch zustande, dass in den an der Pathogenese beteiligten Makrophagen vermehrt 25(OH)D in 1,25(OH)₂D umgewandelt wird [34].

Erniedrigte 25(OH)D-Werte können auch bei Patienten mit Hypothyreoidismus beobachtet werden [34].

Daneben sind auch einige genetische Dispositionen bekannt, die einen Einfluss auf den Vitamin D-Status haben. Ein Beispiel hierfür ist die Vitamin-D-abhängigen Rachitis Typ 1, bei der es aufgrund einer Mutation im renalen CYP27B1-Gen zu einer verminderten Synthese

von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ kommt [34]. Die Vitamin-D-abhängige Rachitis Typ 2 wird durch eine Mutation im VDR-Gen hervorgerufen [34]. Durch den Wegfall des negativen Rückkopplungsmechanismus kommt es zu erhöhten $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Werten [34]. Ähnliches liegt bei der Vitamin-D-abhängigen Rachitis Typ 3 vor, bei der es zu einer Überproduktion der HRE- (= hormone responsive element) Bindungsproteinen kommt [34]. Bei der autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis (Mutation im FGF23-Gen) und bei der X-chromosomal hypophosphatämischen Rachitis (Mutation im PHEX-Gen) kommt es aufgrund einer erhöhten FGF23-Konzentration neben Hypophosphatämie zu einer verminderten Aktivität des renalen CYP27B1-Enzyms und damit zu erniedrigten $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Werten [34].

Wang et al. identifizierten in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) drei Genloci (SNPs), die mit dem Vitamin D-Status assoziiert sind [91]. Der erste dieser 3 Loci liegt im Bereich des DHCR7/NADSYN1-Gens, das die $\text{DHC-}\Delta^7$ -Reduktase codiert [91]. Eine schon länger bekannte seltene Mutation innerhalb diesem Gen führt zu einem Syndrom, das sich durch niedrige $\text{DHC-}\Delta^7$ -Reduktase-Aktivität, eine Akkumulation von 7-DHC, niedrige Cholesterolspiegel und mehrere angeborene Anomalien auszeichnet, das sogenannte Smith-Lemli-Opitz Syndrom [91, 85]. Der zweite Genlocus, bei dem Wang et al. einen signifikanten Zusammenhang mit $25(\text{OH})\text{D}$ -Spiegeln gefunden haben, ist 11p15 im Bereich des CYP2R1-Gen, das das gleichnamige Enzym codiert [91]. Ein signifikanter Zusammenhang wurde auch für den Genlocus 4p12 für das GC-Gen festgestellt, das DBP codiert [91].

2.3. Die Hautpigmentierung des Menschen

Der Faktor, der die Bildung von Vitamin D entscheidend mitbestimmt und für diese vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist, wurde bisher nur kurz erwähnt: die Hautpigmentierung [34]. Die Hautpigmentierung wird im Wesentlichen von vier Biofarbstoffen hervorgerufen: das rote Oxyhämoglobin, das blaue Desoxyhämoglobin, die gelben Carotinoide und - das wichtigste Hautpigment - das braune Melanin [9]. Melanin ist in der Lage UV-Licht im Wellenlängenbereich von 290 bis 700 nm zu absorbieren [13]. Genau in diesen Bereich fällt aber auch das UVB-Licht, das ja für die Photolyse von 7-DHC zu Prävitamin D von essentieller Bedeutung ist [13]. Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll bei der Suche und dem Verständnis nach Faktoren, die den Vitamin D-Serumspiegel beeinflussen, auch die Frage zu klären, welche Rolle dabei genetische Faktoren spielen, die einen Einfluss auf die Hautpigmentierung haben.

Es gibt drei Haupttypen von Melanin: das hellere rötlich-gelbe Pheomelanin und zwei Typen von Eumelaninen, bei denen es sich um braun-schwärzliche Pigmente handelt [9]. Produziert wird Melanin von speziellen Zellen, den sogenannten Melanozyten [22]. Diese sitzen der Basalmembran von Epidermis und Haarfollikeln unmittelbar auf [22]. Jeder Melanozyt steht mit ca. 36 Keratinozyten in Kontakt, an die er die gebildeten Pigmente abgibt, was als epidermale Melanineinheit bezeichnet wird [9]. Physiologische Funktion des Melanins ist die Absorption schädlicher UV-Strahlung, das Abfangen von im Zytoplasma gebildeten freien Radikalen und der Schutz der Zellen vor Strahlung [87].

Die Melanozyten entstammen aus der embryonalen Neuralleiste [87]. Sie bilden dort eine vorübergehende Zellpopulation im dorsalen Bereich des sich schließenden Neuralrohres [87]. Die Melanozyten-Zellreihe entsteht, indem von diesen Zellen der Transkriptionsfaktor MITF gebildet wird, auf den weiter unten noch genauer eingegangen wird [87]. Von der Neuralleiste wandern die Melanozytenvorläufer in Form von Melanoblasten in ihre verschiedenen Zielgewebe (wie z. B. die Haut) aus und differenzieren dort zu Melanozyten [9].

Während der Melanozytenentwicklung spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle, von denen einige im Folgenden kurz erläutert werden: Wnt sind sezernierte Glykoproteine, die an Membranrezeptoren aus der Frizzled-Familie binden [87]. Diese Bindung verhindert über einen komplexen intrazellulären Mechanismus den Abbau von β -Catenin im Proteasom [87]. β -Catenin kann dadurch in den Zellkern gelangen, wo es an Transkriptionsfaktoren bindet und die Expression der sogenannten Wnt-Zielgene erhöht [87]. Eines dieser Zielgene von Wnt ist der Transkriptionsfaktor MITF (microphthalmia-associated transcription factor) [87].

MITF wiederum erhöht die Transkription wichtiger Gene für die Melaninsynthese (s.u.) und ist auch für den Stopp des Zellzyklus verantwortlich [87].

Ein weiteres wichtiges Protein für die Melanozytenentwicklung ist die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Kit (C-KIT) [87]. Diese ist charakteristisch für die Melanozyten Zellreihe und spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen des Wachstums und der Differenzierung der embryonalen Melanoblasten [87]. Ligand des c-KIT-Rezeptors ist das Zytokin SCF (steel factor/stem cell factor/KITLG) [9].

Endotheline sind Wachstumsfaktoren, die aus endothelialen Zellen stammen [87]. Hier von Bedeutung ist Endothelin 3 (ET3), das an den Endothelin B Rezeptor (EDNBR) auf der Melanoblastenmembran bindet [87]. ET3 ist dadurch an Überlebens- und Auswanderungsprozesse der Melanoblasten beteiligt [87]. Auch Endothelin 1 (ET1) spielt eine Rolle bei der Melanozytenentwicklung [76].

Weitere wichtige Faktoren sind die Cadherine [87]. Hierbei handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige Oberflächenrezeptoren, die die Zell-Adhäsion, Zielsuche und die Invasion von Zellen vermitteln [87]. Für die Melanozytenentwicklung von Bedeutung ist v.a. E-Cadherin [76].

Auch die beiden Wachstumsfaktoren bFGF (basic fibroblast growth factor) und NGF (nerve growth factor) spielen eine Rolle in der Melanozytenentwicklung [76].

Neben diesen genannten gibt es noch sehr viele weitere Einflussfaktoren, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird und zu denen auch noch nicht alle Details geklärt sind [9, 87]. Verantwortlich für die Melaninproduktion innerhalb der Melanozyten sind spezialisierte Zellorganellen, die als Melanosomen bezeichnet werden [22]. Diese durchlaufen während ihrer Reifung vier Reifungsstadien [22]. Beim Stadium I, den sogenannten Prämelanosomen, handelt es sich um abgeschnürte Vakuolen aus dem glatten Endoplasmatischen Retikulum (gER) [87]. Für die Funktion der Melanosomen wichtige Enzyme und Strukturproteine werden im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und dem Golgi-Apparat, als zentrale Verpackungsstation der Zelle zugeführt [87]. Dort werden die Enzyme und Strukturproteine in Vakuolen abgepackt, die mit den Prämelanosomen verschmelzen [87]. Die Prämelanosomen gehen durch diesen Vorgang in Stadium II über [87]. Pheomelanin produzierende Melanosomen verbleiben vermutlich in diesem Stadium II [76]. Eumelanin produzierende Melanosomen entwickeln sich weiter zu Stadium III und IV, indem sie weitere Enzyme und Strukturproteine aufnehmen [87]. Während ihrer Reifung wandern die Melanosomen mit Hilfe des Zytoskeletts entlang den Dendriten peripherwärts und werden dort in einem noch nicht genau bekannten Vorgang an die Keratinozyten abgegeben und in

deren Zytosol eingelagert [87]. Diskutiert werden Phagozytose- oder Exozytosevorgänge [87].

UV-Licht führt dazu, dass in den basophilen Zellen der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) vermehrt das Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) produziert wird [45, 76]. Aus dem POMC-Molekül können durch Proteolyse mehrere Peptidhormone herausgeschnitten werden [45]. Dazu zählen u.a. das Melanozytenstimulierende Hormon (α -MSH) und das Adrenocorticotropin (ACTH) [45]. Die wichtigere Quelle zur Regulation der Hautpigmentierung ist allerdings lokal in den Keratinozyten produziertes α -MSH, welches UV-induziert gebildet wird [86]. In diesem Zusammenhang wurde auch berichtet, dass p53 als Antwort auf eine UV-Bestrahlung Promotoren des POMC-Gens stimulieren kann [14].

α -MSH und ACTH binden an einen Rezeptor auf der Melanozytenmembran, den Melanocortin-Rezeptor-1 (MC1R) [86]. MC1R ist ein transmembraner G-Proteingekoppelter Rezeptor, dessen Expression durch UV-Licht gesteigert wird [9, 86]. Wenn α -MSH an MC1R gebunden hat, aktiviert die GTP-Gs α -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatcyclase [9, 76]. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, was wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert [9, 76]. ACTH ist neben der Aktivierung des cAMP-Signalweges zusätzlich in der Lage durch Bindung an den MC1R über den IP₃/DAG-Signalweg die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren [86]. Die PKA verlagert sich nach ihrer Aktivierung in den Zellkern, wo sie den Transkriptionsfaktor CREB/ATF1 (cAMP responsive element binding/activating transcription factor 1) phosphoryliert und damit aktiviert [99]. CREB/ATF1s erhöhen die Transkription des MITF-Gens [99]. MITF steigert die Transkription von Genen, die melanozytenspezifische Proteine TYR, TYRP1 und DCT codieren [76]. Diese Proteine werden wie oben schon beschrieben am rauen ER translatiert und schließlich über den Golgi-Apparat in die Melanosomen verschickt [87].

ASIP (Agouti signalling protein) kann ebenfalls an MC1R binden, antagonisiert aber dessen Funktion [83]. Es verhindert, dass α -MSH an seinen Rezeptor binden kann und inhibiert die Funktion von MC1R [83]. Dadurch wird die Eumelaninsynthese gehemmt [83].

Die Melaninsynthese innerhalb der Melanosomen beginnt mit dem kupferhaltigen Schlüsselenzym Tyrosinase (TYR). Dieses Enzym hydroxyliert zunächst die Aminosäure Tyrosin zu Dopa und oxidiert dieses wiederum zu Dopachinon [76, 81]. Dopachinon reagiert durch eine spontane Zyklisierung weiter über das Zwischenprodukt Leucodopachrom zu

Dopachrom [27]. Hier gibt es nun zwei Möglichkeiten wie Dopachrom weiter reagieren kann: Bei der ersten Reaktionsmöglichkeit wird Dopachrom zunächst spontan decarboxyliert. Dabei entsteht 5,6-Dihydroxyindol (DHI) [9, 87]. Anschließend wird das DHI durch die Tyrosinase in Indol-5,6-chinon überführt und polymerisiert schließlich zum sogenannten DHI-Melanin [9, 87]. Dieses Melanin ist dunkelbraun bis schwarz [9, 87].

Bei der zweiten Reaktionsmöglichkeit läuft zuerst eine Tautomerisierung ab [9, 87]. Diese Reaktion wird von dem Enzym TYRP2 (TRP2/tyrosinase-related-protein 2/DCT/Dopachrom-Tautomerase) katalysiert [9, 87]. Dabei entsteht aus Dopachrom 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) [9, 87]. DHICA wiederum wird durch die beiden Enzyme Tyrosinase und TYRP1 (TRP1/tyrosinase-related-protein 1/DHICA-Oxidase) zunächst in Indol-5,6-chinon-2-carbonsäure überführt, bevor es zum sogenannten DHICA-Melanin weiterreagiert [9, 87]. Dieses Melanin ist hellbraun [9, 87].

Bei Eumelanin handelt es sich also um ein Gemisch aus DHI- und DHICA-Melanin [9, 87].

Die Pheomelaninsynthese läuft nur in Anwesenheit von Cystein oder Glutathion ab [76]. Eine basale Tyrosinaseaktivität führt zur Pheomelaninsynthese, während aus einer erhöhten Tyrosinaseaktivität eine vermehrte Eumelaninsynthese resultiert [87, 76]. Cystein bzw. Glutathion können sich an Dopachinon anlagern, sodass Cysteinyldopa entsteht [87]. Dieses reagiert weiter zu Benzothiazin und schließlich zu Pheomelanin [27].

Ancans et al. stellten fest, dass die Tyrosinase nahe einem neutralen pH-Wert am besten arbeitet [3]. Da die Melanosomen mit Lysosomen verwandt sind, also einen sehr sauren pH-Wert aufweisen (< 4), gibt es Mechanismen, die den pH-Wert lokal in den neutralen Bereich verschieben [3]. Dieser Mechanismus läuft über das P-Protein ab, ein Protein innerhalb der Melanosomenmembran, das kleine Moleküle (small molecules) transportieren kann [3]. Es wird vom OCA2-Gen (Oculocutaneous albinism II) codiert, das auch dafür bekannt ist, dass es durch Mutationen zu einem Okulokutanen Albinismus Typ 2 kommen kann, wovon sich der Genname ableitet [76]. Auch Ionentransporter sind für die Funktion der Melanosomen von Bedeutung [76]. Hierzu zählen v.a. Transporter aus der Familie der solute carrier (SLC) [76]. Die Ionentransporter SLC24A4 und SLC24A5 sind K^+ -abhängige Na^+/Ca^{2+} -Austauscher innerhalb der Melanosomenmembran [76]. Ähnliche Funktion besitzt der Ionenkanal TPCN2 (two-pore segment channel 2) [76]. Ein anderer Vertreter der SLC-Familie ist der Ionenaustauscher SLC45A2, der auch als MATP (membrane associated transporter protein) bezeichnet wird [76]. Er scheint eine Funktion bei der Sortierung der Melanosomenenzyme während deren Reifung zu haben [76].

Die wichtigsten Abläufe in den Melanozyten sind in den folgenden Abbildungen (Abbildung 1 und 2) noch einmal veranschaulicht.

Abbildung 1

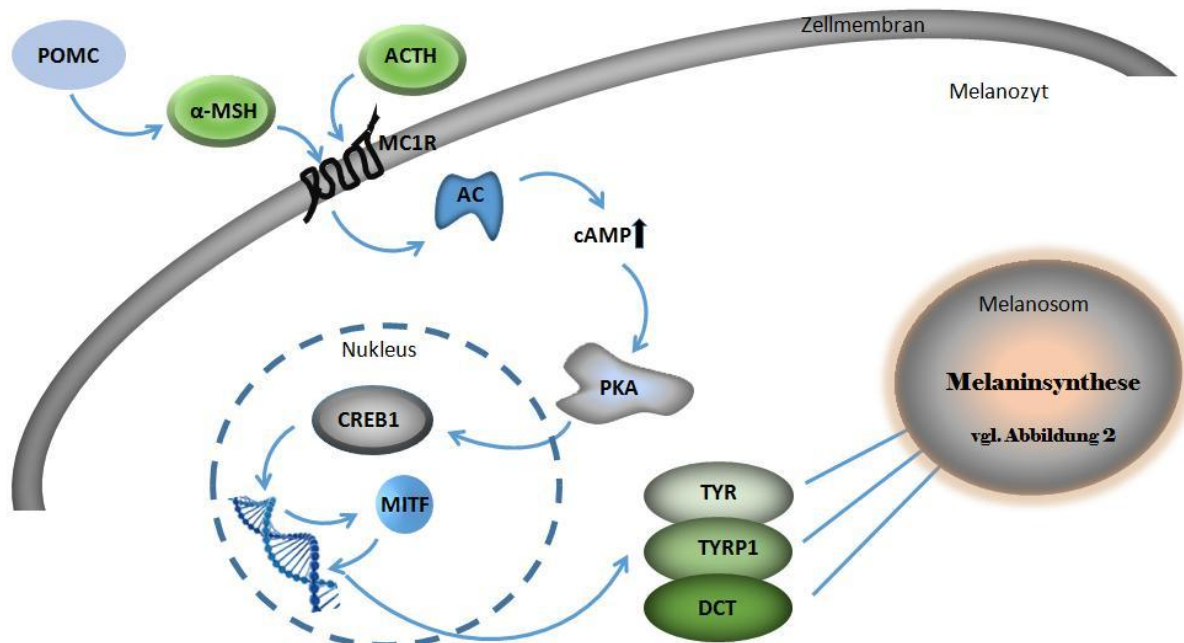


Abbildung 1: Abgebildet ist der Pigmentierungssignalweg. POMC: Proopiomelanocortin; α-MSH: Melanozyten stimulierendes Hormon; ACTH: Adrenocorticotropes Hormon; MC1R: Melanocortin 1 Rezeptor; AC: Adenylatezyklase; cAMP: 3',5'-zyklisches AMP; PKA: Proteinkinase A; CREB1: cAMP responsive element binding protein 1; MITF: Microphthalmia-assoziiierter Transkriptionsfaktor; TYR: Tyrosinase; TYRP1: Tyrosinase-related protein 1; DCT: Dopachromtautomerase. α-MSH bindet an seinen Rezeptor MC1R, was eine Signalkaskade startet, an deren Ende die Enzyme für die Melaninsynthese TYR, TYRP1 und DCT vermehrt gebildet werden.

Abbildung 2

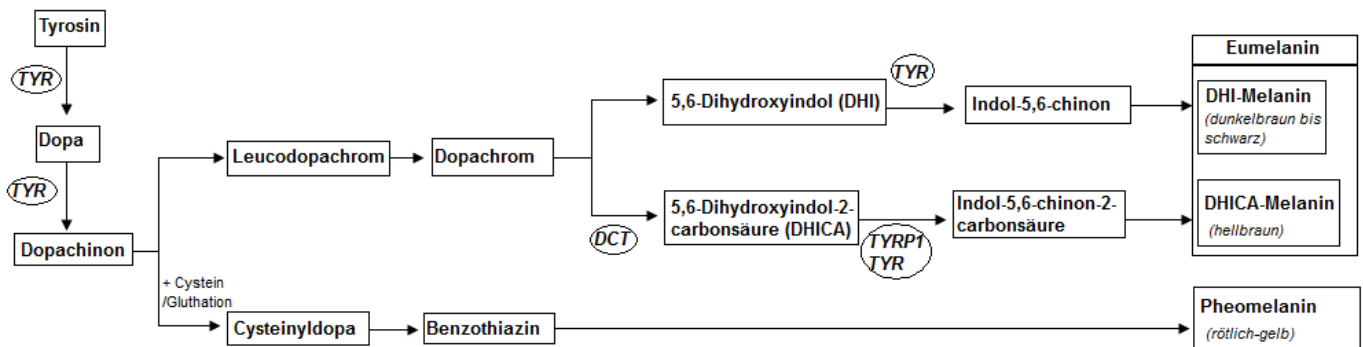


Abbildung 2: Abgebildet sind die Reaktionsschritte der Melaninsynthese im Melanosom. Die beteiligten Enzyme sind eingekreist: TYR: Tyrosinase; TYRP1: Tyrosinase-related protein 1; DCT: Dopachromtautomerase. Modifiziert nach [27]

Eine interessante Frage ist nun, wie die unterschiedliche Pigmentierung zwischen einzelnen Bevölkerungsgruppen, aber auch individuelle Unterschiede zustande kommen.

Die Hautfarbe wird im Wesentlichen durch komplexe genetische Mechanismen hervorgerufen, allen voran Polymorphismen im MC1R-Gen [9]. Diese Variationen verursachen Unterschiede in der Pigmentierung von extrem heller bis extrem dunkler Haut

[9]. Weitere wichtige Faktoren sind die Zahl der Melanozyten, die Expression und Funktion der Enzyme und Strukturproteine im Melanosom, die Menge der synthetisierten Melaninformen, der Transport der Melanosomen zu den Dendriten und den Keratinozyten und die Verteilung des Melanins in den Schichten der Epidermis [9]. Dunkelhäutige haben im Vergleich zu Hellhäutigen mehr Melanosomen, die zudem größer und ovaler sind [22]. Darüber hinaus sind im Zytoplasma der Keratinozyten die Melanosomen bei Dunkelhäutigen einzeln angeordnet, während bei Hellhäutigen membranumschlossene Melanosomenkomplexe vorliegen [22]. Die Melanosomenkomplexe können weniger Licht absorbieren, weshalb die Haut hell erscheint [22]. Vergleicht man den Melaningehalt innerhalb der Epidermis, so stellt man fest, dass Melanin in den unteren Zellschichten der Epidermis am dichtesten ist [22]. In den oberen Schichten findet ein enzymatischer Abbau statt, der bei Weißen im Stratum spinosum abgeschlossen ist [22]. Bei Dunkelhäutigen finden sich dagegen noch Melaninreste bis ins Stratum corneum [22].

Neben genetischen Variationen im MC1R-Gen, die die Hautpigmentierung beeinflussen, wurden bereits viele Polymorphismen in vielen weiteren Genen beschrieben, darunter auch die Gene der hier erwähnten Proteine [76, 81]. Neben der Hautpigmentierung legen Polymorphismen ebenso die Farbe der Iris und die Haarfarbe fest [9]. Eine Einteilung der verschiedenen Pigmentierungstypen (I-VI) nahm Fitzpatrick im Jahr 1975 vor, wie in Tabelle 4 gezeigt wird.

Hauttyp	Hautfarbe	Entwicklung von Sonnenbrand/ Sonnenbräune
I	sehr helle Haut, Sommersprossen, rote Haare, helle Augen (keltischer Typ)	verbrennt praktisch immer/ bräunt praktisch nie
II	helle Haut, blonde Haare, helle Augen (skandinavischer Typ)	verbrennt leicht/ bräunt minimal
III	hellbraune Haut, hellbraune bis dunkel braune Haare, helle oder braune Augen (Mischtyp)	verbrennt gelegentlich/ bräunt gut
IV	mittelbraune Haut, dunkle Haare, dunkle Augen (mediterrane Typ)	verbrennt selten/ bräunt sehr gut
V	dunkelbraune Haut (asiatischer Typ, Orientalen, Lateinamerikaner)	verbrennt sehr selten/ bräunt sehr gut
VI	schwarze Haut (Afrikaner, Afroamerikaner)	verbrennt extrem selten bis gar nicht/sehr dunkle Pigmentierung

Tabelle 4: Hauttypen nach Fitzpatrick [27].

Doch in wie weit hängt nun die Hautpigmentierung mit dem Vitamin D zusammen? Zum einen stellten Abdel-Malek et al. 1988 fest, dass Melanozyten den VDR besitzen [1]. Es wird daher angenommen, dass Vitamin D in der Haut einen melanogenen Effekt bewirken kann [1].

Zum anderen ist wie oben schon beschrieben das Melanin in der Lage UV-Licht zu absorbieren, und zwar im Wellenlängenbereich von 290 bis 700 nm [13]. Darunter fällt somit auch der UVB-Bereich (290-315 nm), der ja für die Vitamin D-Synthese von großer Bedeutung ist [13]. Dies führt dazu, dass bei Personen mit Hauttyp VI im Vergleich zu Personen mit Hauttyp II die Kapazität zur Bildung von Vitamin D um bis zu 95 % vermindert ist [38].

2.4. Polymorphismen

In der vorliegenden Arbeit wurden SNPs in Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung untersucht. Bei SNPs (single nucleotide polymorphism) handelt es sich um sogenannte Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (Einzelbasen- Polymorphismen) [98]. Dabei ist eine einzelne Base der DNS gegen eine andere ausgetauscht (z. B. C anstelle von T) [98]. Der Unterschied zu einer Mutation liegt darin, dass ein Polymorphismus mit einer Frequenz von über 1 % innerhalb einer Population vorkommt, während die Häufigkeit einer Mutation unter 1 % liegt [98]. SNPs sind mit 80 % die häufigsten vorkommenden Variationen im menschlichen Genom, von dem geschätzt wird, dass es insgesamt 10 Millionen SNPs enthält [17, 98]. Dies entspricht einem Vorkommen eines SNP durchschnittlich alle 1200 Basen, wobei einige Regionen reicher an SNPs sind, während in anderen fast keine zu finden sind [17].

Je nach Lage auf der DNS können SNPs verschiedene Auswirkungen auf das Genprodukt haben: Da 95 % des menschlichen Genoms aus nichtkodierender DNS besteht, ist hier auch der überwiegende Anteil an SNPs zu finden [17]. Liegt ein SNP vor einem Gen, also in der 5'untranslatierten Region (stromaufwärts), nach einem Gen, also in der 3'untranslatierten Region (stromabwärts), in einem Promotor oder innerhalb eines Introns, besteht die Möglichkeit, dass der SNP die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder das Genspleißen beeinflussen kann [17]. Dadurch kann es zu einer veränderten Transkriptionsrate oder zum sogenannten alternativen Spleißen kommen [17]. Liegt ein SNP innerhalb der codierenden Sequenz (CDS), also innerhalb eines Exons, unterscheidet man zwischen einem synonymen Polymorphismus und einem nichtsynonymen Polymorphismus [17]. Bei synonymen oder stillen Polymorphismen wird trotz einer veränderten Nukleotidsequenz aufgrund der sogenannten Degeneration des genetischen Codes, die Aminosäuresequenz des Genproduktes nicht verändert [17, 29]. Beide Allelvariationen führen zum gleichen Genprodukt [17]. Die nichtsynonymen Polymorphismen, also die Polymorphismen bei denen es zu einer veränderten Aminosäuresequenz im Protein kommt, unterteilt man weiter in konservative und

nichtkonservative Polymorphismen [17]. Bei konservativen Polymorphismen finden sich nur geringe Effekte in der Proteinstruktur oder - Funktion, während bei nichtkonservativen hier sehr starke Veränderungen auszumachen sind [17]. Einige SNPs können auch ein verfrühtes Stoppcodon in die Sequenz einfügen, sodass es bei der Translation zu einem vorzeitigen Abbruch kommt, was als Nonsense bezeichnet wird [17].

Neben SNPs gibt es noch andere, seltenere Formen von Polymorphismen [17]. Dazu gehören zum einen Deletionen bzw. Insertionen, bei denen es zu einem Verlust bzw. Zugewinn zwischen 1 und 1000 Nukleotiden in der DNS-Sequenz kommt [17]. Zum anderen die Tandem Repeats (TR), die entweder als Wiederholung eines Sequenzmusters zwischen 2 und 10 Nukleotiden (Mikrosatellit), als Wiederholung zwischen 10 und 100 Nukleotiden (Minisatellit) oder als Wiederholung zwischen 100 und 1000 Nukleotiden (Satellit), vorkommen können [17]. Bei Wiederholungen über 1000 Nukleotiden spricht man von Kopienzahlvariationen (copy number variation, CNV) [17]. In der vorliegenden Arbeit werden allerdings nur SNPs betrachtet.

2.5. Fragestellung

Die Ausführungen machen deutlich, dass die Hautpigmentierung ein wichtiger Faktor ist, der den Vitamin D-Haushalt beeinflusst. Darüber hinaus gibt es Überlegungen, dass dem Vitamin D in der Evolution des Menschen für die Entwicklung der Vielseitigkeit der Hautpigmentierung eine entscheidende Rolle zukommt [38]. Es ist bereits bekannt, dass dunkelhäutige Menschen, die außerhalb der Äquatorregionen leben, einen niedrigeren Vitamin D-Spiegel aufweisen [38]. Jedoch ist wie oben gezeigt die individuelle Vielfalt an Variationen im Phänotyp der Hautpigmentierung viel umfassender und komplexer als eine einfache Unterscheidung in schwarz und weiß. Die an der individuellen Hautfarbe beteiligten Gene und deren Veränderungen, wie z.B. SNPs, sind wahrscheinlich bei weitem noch nicht alle bekannt. Die Fragestellung dieser Arbeit liegt darin, erstmals in einer Kohorte von Patienten kaukasischer Herkunft zu untersuchen in wieweit SNPs, die in einigen der oben genannten Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung liegen, Auswirkungen auf den 25(OH)D-Status haben und so ein weiterer wichtiger Baustein im Verständnis des in der Bevölkerung weit verbreiteten Vitamin D-Mangels zu finden. Der Gedanke dabei ist, dass einige dieser Polymorphismen die Hautpigmentierung innerhalb der kaukasischen Bevölkerung derart beeinflussen könnten, dass es zu einer nachweisbaren erhöhten oder verminderten 25(OH)D-Konzentration im Serum kommt.

3. Material und Methoden

3.1. Die Studienpopulation: LURIC-Studie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Daten stammen aus der sogenannten LURIC-Studie und wurden von den LURIC-Mitarbeitern zur Auswertung zur Verfügung gestellt [Mannheimer Institut für Public Health, Sozial- und Präventivmedizin, Universität Heidelberg]. LURIC ist die Abkürzung von *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study*. Bei dieser Studie handelt es sich um eine fortlaufende prospektive klinikbasierte Kohortenstudie, in der ökologische, biochemische und genetische Risikofaktoren für das Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK) untersucht wurden [94]. Die Studie umfasst 3.316 Patienten kaukasischer Herkunft, die in den Jahren zwischen 1997 und 2000 wegen einer Koronarangiographie im Klinikum Ludwigshafen behandelt wurden [94]. Klinische Indikationen für eine Koronarangiographie waren Brustschmerzen oder nicht-invasive Tests, die auf eine Myokardischämie schließen ließen.

Die KHK wurde durch die Angiographie beurteilt, wofür die durch die Bildgebung geschätzte maximale Verengung des Lumens herangezogen wurde. In der LURIC-Studie wurde eine klinisch relevante KHK definiert als das Auftreten von mindestens einer Stenose größer oder gleich 20 % in mindestens einem von 15 Koronarabschnitten. Patienten, die Stenosen kleiner als 20 % aufwiesen wurden als Kontrollgruppe herangezogen. Um die klinischen Heterogenität zu begrenzen wurden alle Patienten, die an einer anderen Erkrankung als an einer KHK litten, wie z. B. chronische nichtkardiale oder bösartige Erkrankungen innerhalb der letzten fünf Jahren, von der Studie ausgeschlossen.

Die Studie wurde genehmigt durch die Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz und wurde durchgeführt in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von allen Teilnehmern der Studie unterschrieben [94].

Den Studienteilnehmern wurde nach einer über Nacht andauernden Nüchternheit unter standardisierten Bedingungen venöses Blut entnommen.

Die genomische DNS wurde aus EDTA-Blut durch einen üblichen Aussalzungsprozess isoliert. Innerhalb 30 Minuten nach der Venenpunktion wurde das restliche Blut 10 Minuten lang mit 3.000 g zentrifugiert, sofort danach aufgeteilt (aliquotiert) und bei -80°C für weitere Analysen eingefroren. Die Serumspiegel von 25(OH)D wurden gemessen, indem ein

Radioimmunoassay [DiaSorin SA, Antony, Frankreich] durchgeführt wurde. Der Intra- bzw. der Inter-Assay-Variationskoeffizient hatte eine Schwankung von 8,6 % bzw. 9,2 %.

Die Genotypisierung wurde unter Verwendung des Affymetrix Human SNP Array 6.0 im LURIC-Studienzentrum in Heidelberg durchgeführt. Als Referenz zur Imputation dienten die Daten aus MACH 1.0 [53] und HapMap II CEU. Nach der Imputation waren 2.543.887 SNPs verfügbar.

Von diesen Daten wurden SNPs innerhalb oder in der Nähe von 29 Genen ausgewählt (s.u.).

3.2. Relevante Daten aus der LURIC-Datenbank

Aus der LURIC-Datenbank wurden die notwendigen Daten extrahiert. Bei den 29 Genen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, handelt es sich im Einzelnen um ASIP, ATF1, CDH1, CTNNB1, DCT, EDN1, EDN3, EDNRB, EXOC2, FGF2, IRF4, KIT, KITLG, MITF, NGF, OCA2, POMC, PRKACB, PRKACG, PRKAR1A, PRKAR2A, PRKAR2B, SLC24A4, SLC45A2, TP53, TPCN2, TUBB3/MC1R, TYR und TYRP1. Auswahlkriterium der Gene war eine bekannte oder naheliegende Assoziation mit der Hautpigmentierung (vgl. Einleitung).

In Tabelle 5 sind alle 29 analysierten Gene mit ihrem jeweiligen Genprodukt, Bezeichnungen, Lokalisation auf ihrem Chromosom und eine kurze Angabe ihrer Funktion aufgelistet. Die einzelnen Funktionen sind in der Einleitung bereits ausführlich aufgeführt worden.

Gen ^[39]	Genprodukt ^[76]	Synonyme/ vollständiger Name ^[39]	Chromosomen- lokalisation ^[76, 39]	Funktion ^[14, 76, 87]
Agouti Gen	ASIP	agouti signalling peptide	20q11.2-q12	Antagonist des MC1R, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
ATF1	ATF1	activation transcription Factor-1	12q13	cAMP abhängiger Transkriptionsfaktor Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
CDH1	E-Cadherin	Cadherin 1	16q22.1	Adhäsionsproteine in Desmosomen und Adherens junctions
CTNNB1	β-Catenin		3p21	Teil der Adherens Junctions
EDN1	ET-1	Endothelin 1	6p24.1	vasoaktives Peptid, wichtig für die Entwicklung von aus der Neuralleiste stammenden Zellen wie Melanozyten
EDN3	ET-3	Endothelin 3	20q13.2-q13.3	vasoaktives Peptid, wichtig

				für die Entwicklung von aus der Neuralleiste stammenden Zellen wie Melanozyten
EDNRB	EDNRB	Endothelin-Rezeptor Typ B	13q22	Endothelin-Rezeptor
EXOC2	EXOC2	exocyst complex component 2	6p25.3	Teil eines Proteinkomplexes zur Exocytose
FGF2	FGF2	basic fibroblast growth factor	4q26	Regulation der embryonalen Entwicklung und Differenzierung verschiedener Zelltypen
IRF4	IRF4	interferon regulatory factor	6p25-p23	B-Zell Proliferations-/Differenzierungs- Protein
KIT	KIT	CD117/ c-Kit/ Stammzellfaktor-Rezeptor	4q11-q12	Rezeptor- Tyrosinkinase
KITLG	KITLG	KIT Ligand/ SCM/Stem cell factor	12q22	Zytokin, bindet an KIT Förderung der Migration, Überleben und Proliferation von Melanozyten
MITF	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	3p14.1-p12.3	Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
NGF	NGF	nerve growth factor	1p13.1	Melanozytenentwicklung
OCA2	OCA2	oculocutaneous albinism II	15q11.2-q12	Membranprotein, in Tyrosintransport eingebunden Mutationen führen zu Okulokutanem Albinismus Typ 2
POMC (MSH)	POMC (MSH)	Proopiomelanocortin (Melanozyten-stimulierendes Hormon)	2p23	Agonist des MC1R
PRKACB	PRKACB	Proteinkinase A katalytische Untereinheit Typ β	1p36.1	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
PRKACG	PRKACG	Proteinkinase A katalytische Untereinheit Typ γ	9q13	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
PRKAR1A	PRKAR1A	Proteinkinase A regulatorische Untereinheit Typ 1 α	17q23-q24	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
PRKAR2A	PRKAR2A	Proteinkinase A regulatorische Untereinheit Typ 2 α	3p21.3-p21.2	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
PRKAR2B	PRKAR2B	Proteinkinase A regulatorische Untereinheit Typ 2 β	7q22.3	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten
SLC24A4	SLC4A4	solute carrier 23 A 4	14q32.12	K^+ -abhängiger Na^+/Ca^+ - Austauscher in der Melansommembran

SLC45A2/ MATP	SLC45A2/ MATP	solute carrier 45 A 2/membrane associated transporter protein	5p13.3	Sortierung melanosomaler Enzyme während der Melanozytenentwicklung
TP53	p53		17p13.1	Stimulation der POMC Transkription
TPCN2	TPCN2	two-pore segment channel 2	11q13.1	Ionenkanal für Ca^{2+} in der Melanosommembran
TUBB3/ MC1R	TUBB3	Tubulin β III	16q24.3	benachbartes Gen (downstream) von MC1R
TYR	TYR	Tyrosinase	11q14-q21	Melaninsynthese
TYRP1	TYRP1/DHIC- Oxidase	tyrosinase-related protein 1	9p23	Melaninsynthese
TYRP2/ DCT	TYRP2/DCT	tyrosinase-related protein 2/ Dopachrom- Tautomerase	13q32	Melaninsynthese

Tabelle 5: In dieser Arbeit analysierte Gene

Innerhalb oder in der Nähe dieser Gene wurden insgesamt 960 SNPs von 2.970 Patienten der LURIC-Studie untersucht. Die Diskrepanz zu der Gesamtanzahl von Teilnehmern der LURIC-Studie (3.316 Patienten) kommt dadurch zustande, dass nicht von allen sowohl die 25(OH)D-Werte als auch die Genotypsequenz der analysierten SNPs vorhanden war.

Die SNPs sind mit ihrem Gen und ihrer rs-Nummer codiert (z.B. IRF4 rs9501958). Für jeden Patienten ist zu jedem einzelnen SNP – sofern bekannt – der Genotyp in Form des ersten Buchstabens der zugehörigen Nukleoside (A, T, G bzw. C) angegeben. So weist z.B. der Patient mit der LURIC ID Nr. 1 für den SNP IRF4rs9501958 den Genotyp G G auf, d.h. auf seinen beiden Allelen liegt bei ihm an der Position dieses SNPs das Nukleosid Guanodin vor.

3.3. Statistische Methoden

Die statistischen Analysen wurden mithilfe des SPSS-Programms [SPSS 20, IBM Co., Armonk, NY (USA)] durchgeführt.

Zunächst wurde für jeden einzelnen der insgesamt 960 SNPs für seine jeweiligen drei möglichen Genotypen (z.B. AA, AT und TT) Mittelwert, Standardabweichung und Median der 25(OH)D-Serumkonzentration berechnet.

Test auf Normalverteilung

Zur Überprüfung ob die 25(OH)D-Konzentration in der untersuchten Kohorte normalverteilt ist, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Nullhypothese lautete: „Die 25(OH)D-Konzentration ist normalverteilt.“

Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test

Um eine Vorauswahl treffen zu können, welche der 960 SNPs einen Effekt auf die 25(OH)D-Serumkonzentration zeigen, die danach weiter analysiert werden können, wurde zunächst für jeden SNP ein Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (Vorauswahl-Test). Getestet wurde dabei ob zwischen den drei möglichen Genotypkombinationen jedes SNPs ein relevanter Unterschied der 25(OH)D-Serumkonzentrationen vorliegt. Die Nullhypothese dieses Tests lautete jeweils: „Die Verteilung von 25(OH)D ist über alle Kategorien (also die drei möglichen Genotypkombinationen z.B. GG, GT und TT) von SNP XY gleich.“ Diese nichtparametrischen Tests wurden gewählt, da die Verteilung der 25(OH)D-Serumkonzentration in der analysierten Kohorte nicht normalverteilt war. Das SPSS-Programm traf dabei die Entscheidung ob der Kruskal-Wallis-Test oder der Mann-Whitney-U-Test bei einem SNP durchgeführt wurde. Für diesen Test wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt, d.h. diejenigen SNPs, die im Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test einen p-Wert kleiner 0,05 aufwiesen wurden für die folgenden Tests eingeschlossen. Von statistischer Signifikanz eines in diesem ersten Test identifizierten SNP konnte allerdings noch nicht gesprochen werden, da hier aufgrund der großen Anzahl an durchgeführten Tests ($n=960$) davon auszugehen war, dass sich unter den identifizierten SNPs noch einige falsch-positive befanden, was als Fehler erster Art bezeichnet wird.

Chi-Quadrat-Test

Die im Vorauswahl-Test identifizierten SNPs (n=46) wurden anschließend wie folgt analysiert: Die Gesamtkohorte wurde in Tertilen (also in drei von der Anzahl der Probanden her annähernd gleich große Gruppen) wie in Tabelle 6 gezeigt aufgeteilt:

Gruppe	25(OH)D-Bereich	Anzahl der Probanden
Gruppe 1	< 11,80 µg/L	990
Gruppe 2	11,80 – 20,10 µg/L	987
Gruppe 3	>20,10 µg/L	993
Gesamt	-	2970

Tabelle 6: Aufteilung der Gesamtkohorte in Tertile

Danach wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests (χ^2 -Test) analysiert ob einer der drei möglichen Genotypen innerhalb einer der drei Gruppen der 25(OH)D-Serumkonzentration überrepräsentiert ist. Die Nullhypothese des Chi-Quadrat-Tests lautete: „Es besteht kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen“, was wiederum an einem Beispiel in Tabelle 7 und Tabelle 8 gezeigt wird.

		CC		CT		TT		N
		beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet	
Gruppen 25(OH)D in µg/L	<11,80	166	139.67	440	470.33	384	380	990
	11,80 - 20,10	138	139.24	484	468.91	365	378.85	987
	>20,10	115	140.09	487	471.76	391	381.15	993
N		419		1411		1140		2970

Tabelle 7: Beispiel für einen SNP erstellte Kreuztabelle für den Chi-Quadrat-Test

Der Test beruht auf dem Vergleich der beobachteten Häufigkeiten in den Zellen mit den erwarteten Häufigkeiten, wenn die Nullhypothese als wahr angenommen wird und die Randsummen in der Kreuztabelle beibehalten werden. Die erwarteten Häufigkeiten ergeben sich als Produkt der jeweiligen Randsummen geteilt durch den Gesamtstichprobenumfang.

Der Freiheitsgrad beträgt 4. Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn das beobachtete, über die Teststatistik errechnete χ^2 größer als der kritische Wert $\chi^2_{\text{krit}} = 9,49$ ($p < 0,05$) ist. Das Ergebnis ist dann auf dem 5 %-Niveau statistisch signifikant. Der χ^2_{krit} -Wert ergibt sich aus

der Chi-Quadrat-Verteilung, die abhängig vom gewählten Signifikanzniveau und von der Anzahl der Freiheitsgrade ist.

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13,207 ^a	4	,010
Likelihood-Quotient	13,254	4	,010
Zusammenhang linear-mit-linear	3,548	1	,060
Anzahl der gültigen Fälle	2970		

Tabelle 8: Output des SPSS-Programms zur Beurteilung der statistischen Signifikanz obiger Kreuztabelle (Tabelle 7) nach Chi-Quadrat-Test

Korrektur für multiples Testen

Zusätzlich wurden alle SNPs, bei denen im Chi-Quadrat-Test ein p-Wert kleiner 0,05 vorlag ($n=24$), einem Korrekturverfahren unterzogen um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des statistischen Fehlers erster Art zu minimieren. Bei dem verwendeten Korrekturverfahren handelt es sich um die sogenannte Benjamini-Hochberg-Prozedur zur Kontrolle der False Discovery Rate (FDR) [6]. Dazu müssen alle p-Werte ihrer Größe nach geordnet werden [89]. Der kleinste p-Wert muss mit der sogenannten Bonferroni-Schranke verglichen werden, also das gewählte ursprüngliche Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$), das durch die Anzahl der Hypothesen geteilt wird (wobei die Anzahl der Hypothesen der Anzahl der in dieser Testreihe durchgeführten Tests ($n=46$) entspricht) [89]. Der erste p-Wert muss also mit $\frac{0,05}{46} = 0,001087$ verglichen werden [89]. Der zweitkleinste p-Wert muss mit dem mit 2 multiplizierten Niveau verglichen werden, also mit $\frac{0,05}{46} \cdot 2 = 0,002174$ [89]. Der drittkleinste p-Wert wird mit dem mit 3 multiplizierten Niveau verglichen [89]. Dieses Verfahren wird für alle p-Werte fortgesetzt [89]. Abgelehnt werden diejenigen Nullhypothesen, deren zugehörige p-Werte kleiner als der größte p-Wert sind, der seine zugehörige Schranke unterschreitet [89].

Hardy-Weinberg-Equilibrium

Zur weiteren Analyse der im Chi-Quadrat-Test identifizierten SNPs wurden diese auf das Vorliegen des sogenannten Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) getestet. Das Vorliegen eines HWE ist notwendig, damit es bei den anschließend durchgeführten allelbasierten Tests (s.u.) nicht zu Verfälschungen kommt [52, 74]. Unter dem HWE verteilen sich die Allele zufällig in der Population, sodass es möglich ist die erwartete Genotypfrequenz anhand der Allelfrequenz zu berechnen [52]. Ein Vergleich zwischen erwarteter und beobachteter Genotypfrequenz erlaubt mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests auf das Vorliegen eines HWE zu testen [52]. Anhand des folgenden Beispiels soll das Prinzip verdeutlicht werden: Betrachtet wird ein Locus mit den beiden Allelen G und T. Die Allelfrequenz von G wird mit p und die Allelfrequenz von T wird mit q bezeichnet [70]. Die Gesamthäufigkeit der Allele G und T beträgt $p + q = 1$ [52]. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Verschmelzung von Spermium und Eizelle ein homozygoter Genotyp entsteht beträgt p^2 für GG bzw. q^2 für TT [70]. Für einen heterozygoten Genotyp GT beträgt die Wahrscheinlichkeit pq und für den Genotyp TG qp , sodass die Gesamtwahrscheinlichkeit für einen heterozygoten Genotyp $2pq$ beträgt [70]. Die Summe aller Genotypfrequenzen beträgt $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ [70].

Jede einzelne Genotypfrequenz muss nun noch mit der Anzahl der Individuen der Kohorte multipliziert werden. Dadurch erhält man die erwartete Anzahl der Genotypen, die nun mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests mit der beobachteten Anzahl der Genotypen verglichen werden kann [52].

	GG	GT	TT	Total
erwartet	Np^2	$N2pq$	Nq^2	$N = a + b + c$
beobachtet	a	b	c	

Tabelle 9: Berechnung der erwarteten Genotypverteilung mit Hilfe der Allelfrequenzen (p und q) und der Anzahl (N) der Individuen der Population, Grundlage für den Chi-Quadrat-Test zur Testung ob ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegt

Der Freiheitsgrad des Tests ist eins [52]. Die Nullhypothese besagt: “Es besteht kein Unterschied zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen“, d.h. Vorliegen eines HWE. Die Nullhypothese wird angenommen, wenn das beobachtete χ^2 kleiner als der kritische Wert (χ^2_{krit}) 10,83 ($p < 0,001$) ist. Zur Berechnung des HWE wurde der Online-Kalkulator auf der Internetseite <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> verwendet [73].

Allelbasierte Tests

Über diese beschriebenen genotypbasierten Tests hinaus wurden die 12 SNPs, die durch die Benjamini-Hochberg-Prozedur identifiziert wurden, allelbasierten Tests unterzogen [52]. Dazu wurde mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert ob einer der beiden möglichen Allelvarianten (z. B. A und T) jedes SNPs innerhalb einer der drei Gruppen der 25(OH)D-Serumkonzentration statistisch signifikant überrepräsentiert ist. Da allerdings keine Daten vorlagen, ob die jeweiligen Allele der analysierten SNPs kodominant, dominant oder rezessiv sind, wurden für jeden SNP drei verschiedene mögliche Modelle von allelbasierten Tests durchgerechnet: 1) das multiplikative Modell für Kodominanz beider Allele, 2) das dominante Modell, wenn das Allel mit dem größeren $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ -Wert (Median der Gesamtkohorte minus Median des Allels) dominant über das andere Allel ist und 3) das rezessive Modell, wenn das Allel mit dem größeren $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$ -Wert rezessiv gegenüber dem anderen Allel ist [52].

Beim multiplikativen Modell werden die Probanden, die einen homozygoten Genotyp aufweisen, ihrem jeweiligen Allel zugeordnet [52]. Alle Probanden mit einem heterozygoten Genotyp werden zweimal in die Untersuchung einbezogen: Sie werden beiden Allelen zugeordnet. Damit es nicht zu einer Verzerrung aufgrund der zweifachen Einbeziehung der Heterozygoten in die Berechnungen kommt, werden die Patienten, die einen homozygoten Genotyp aufweisen, doppelt in die Analyse einbezogen [52]. Abbildung 3 soll dieses Prinzip an einem Beispiel verdeutlichen.

Abbildung 3:

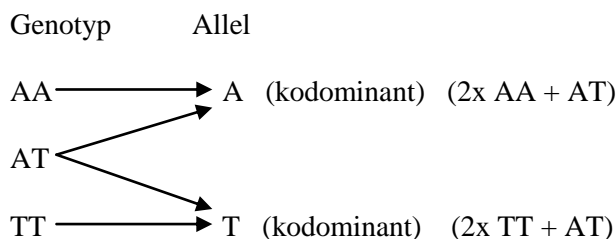


Abbildung 3: Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele im multiplikativen Modell (beide Allele kodominant)

Beim dominanten und rezessiven Modell werden die homozygoten Probanden analog dem multiplikativen Modell der Gruppe mit ihrem jeweiligen Allel zugeordnet [52]. Die Heterozygoten werden allerdings dem dominanten Allel zugeordnet [52]. In Abbildung 4 ist dies an einem Beispiel angezeigt: das ausschlaggebende Allel (also mit dem größeren $\Delta 25(\text{OH})\text{D}$) ist hier das A-Allel. Es wird hier als dominant betrachtet. In Abbildung 5 wird das ausschlaggebende A-Allel als rezessiv betrachtet.

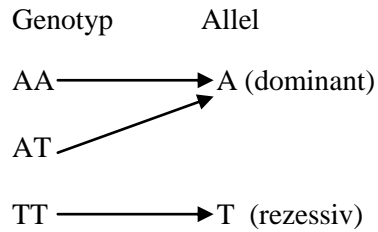
Abbildung 4:

Abbildung 4: Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele, wenn das A-Allel dominant ist

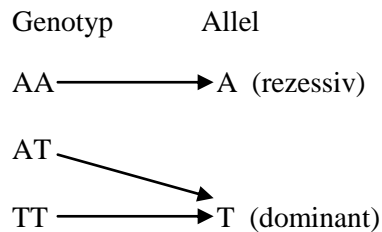
Abbildung 5:

Abbildung 5: Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele, wenn das A-Allel rezessiv ist

Erklärte Varianz

Um den Einfluss der einzelnen SNPs auf den Vitamin D-Status zu bewerten, wurde das sogenannte Bestimmtheitsmaß berechnet. Das Bestimmtheitsmaß wird auch als Determinationskoeffizient bezeichnet und mit R^2 oder B abgekürzt. Mit dem Bestimmtheitsmaß kann abgeschätzt werden, welcher Anteil der Varianz der 25(OH)D-Serumkonzentration von den identifizierten SNPs erklärt wird. Zur Berechnung des Bestimmtheitsmaßes wurde eine Regressionsanalyse mit den natürlichen Logarithmus-Werten der 25(OH)D-Serumkonzentrationen erstellt.

Adjustierung

Um den Einfluss von weiteren Faktoren, die den 25(OH)D-Status beeinflussen können, zu bestimmen, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Als abhängige Variable diente der natürliche Logarithmus von 25(OH)D, als unabhängige Variablen wurden die nach dem Chi-Quadrat-Test und Korrektur für multiples Testen statistisch signifikanten SNPs (n=12) verwendet, sowie die Faktoren Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), Monat der Blutentnahme und das Geburtsjahr. Durch die Verwendung der multiplen Regressionsanalyse wird der interessierende Effekt der SNPs bezüglich den anderen Faktoren adjustiert. Bei der Analyse wird folgende Gleichung aufgestellt:

Gleichung 4:

$$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_m X_m$$

(Y: Zielvariable (25(OH)D); $X_1 \dots X_m$: erklärende Variablen (SNPs, Einflussfaktoren); α , β : Koeffizienten)

Überlebenszeitanalyse

Zusätzlich wurde der Einfluss der einzelnen SNPs auf das Überleben der Patienten betrachtet. Dabei wurde für jeden der identifizierten statistisch signifikanten SNPs mit Hilfe eines Log Rank Test (Mantel-Cox) überprüft, ob zwischen den drei Patientengruppen der verschiedenen Genotypvarianten (z.B. AA, AT und TT) ein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit vorliegt. Die Überlebenszeiten der drei Gruppen wurden für jeden SNP in einer Kaplan-Meier-Kurve veranschaulicht. Desweiteren wurde eine Cox-Regression durchgeführt, bei der der Einfluss der SNPs auf das Überleben gemeinsam untersucht wurde.

4. Ergebnisse

Getestet wurde die Hypothese, dass Variationen (SNPs) in Genen mit Bezug zur Hauptpigmentierung Auswirkungen auf die 25(OH)D-Serumkonzentration haben. Die 25(OH)D-Serumkonzentration und die SNPs (n=960) in Genen (n=29) mit Bezug zur Hauptpigmentierung, wurden in der Probandenkohorte der LURIC-Studie analysiert. Eingeschlossen wurden 2.970 Patienten, von denen 70,2% männlich und 29,8% weiblich waren, und deren Mittelwert der 25(OH) D-Serumkonzentration 17,3 ng/ml betrug, während ein Median von 15,5 ng/ml vorlag.

4.1. Test auf Normalverteilung

Im Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) ergab sich, dass die Werte von 25(OH)D in dieser Kohorte nicht normalverteilt sind (Tabelle 10 und Abbildung 6). Die Nullhypothese („Die 25(OH)D-Konzentrationen sind normalverteilt.“) wurde abgelehnt.

	Kolmogorov-Smirnov		
	Statistik	df	Signifikanz
25-Hydroxy-Vitamin D (µg/L)	0,076	2970	0,000

Tabelle 10: Test auf Normalverteilung

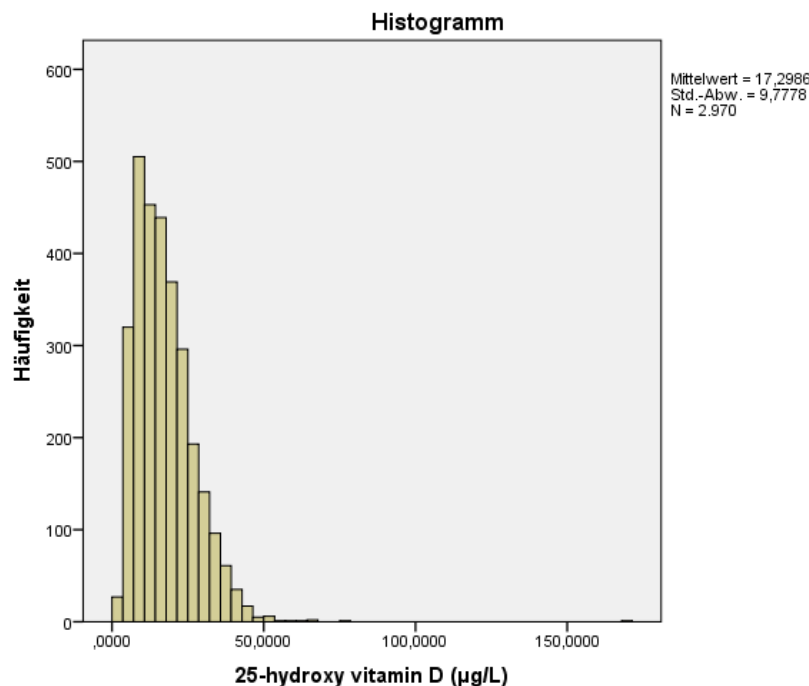


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der 25(OH)D-Serumspiegel

4.2. Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test

Als Ergebnis des Vorauswahl-Tests (Kruskal-Wallis-/Mann-Whitney-U-Test) ergab sich, dass 46 SNPs in 16 verschiedenen Genen mit relevant ($p < 0,05$) höheren bzw. niedrigeren 25(OH)D-Serumspiegel assoziiert waren, verglichen mit der 25(OH)D-Serumkonzentration der Gesamtkohorte (Median: 15,5 ng/ml) bzw. mit einer anderen Allelkombination des jeweiligen SNPs. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11a und 11b zusammengetragen. Die folgenden SNPs waren mit den niedrigsten 25(OH)D-Serumkonzentrationen (Median) im Vergleich zur Gesamtkohorte assoziiert (Tabelle 11a): rs16949906 (DCT), 5,1 ng/ml, $p=0,009$; rs1408797 (TYRP1), 7,2 ng/ml, $p=0,023$; rs12530875 (PRKAR2B), 8,2 ng/ml, $p=0,039$; rs16929263 (TYRP1), 8,3 ng/ml, $p=0,009$; rs17342340 (TYRP1), 8,3 ng/ml, $p=0,011$; rs17407577 (FGF2), 8,8 ng/ml, $p=0,015$; rs16950402 (OCA2), 8,8 ng/ml, $p=0,027$ und rs8034368 (OCA2), 8,8 ng/ml, $p=0,026$.

Die folgenden SNPs waren mit den höchsten 25(OH)D-Serumkonzentrationen (Median) im Vergleich zur Gesamtkohorte assoziiert (Tabelle 11b): rs6123895 (EDN3), 21,8 ng/ml, $p=0,034$; rs16872592 (EDN1), 19,4 ng/ml, $p=0,007$; rs16872602 (EDN1), 19,4 ng/ml, $p=0,007$; rs7356986 (EDN1), 19,4 ng/ml, $p=0,007$; rs389673 (CTNNB1), 19,25 ng/ml, $p=0,024$; rs10747595 (ATF1), 18,95 ng/ml, $p=0,025$; rs17652091 (OCA2), 18,25 mg/ml, $p=0,002$ und rs10876099 (ATF1), 17,3 ng/ml, $p=0,042$.

Tabelle 11a:

SNP	Chromosom	Position	Bande	Typ	Gen	25(OH)D	Konz. (Median)	Δ 25(OH)D (Total- XX)	P-Wert
rs16949906	13	93970524	q32.1	upstream	DCT	CC (n=4): CT (n=157): TT (n=2809): Total (n=2970):	5,10 ng/ml 17,60 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	10,40 ng/ml - 2,10 ng/ml \pm 0,00 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,009
rs1408797	9	12647532	p23	upstream	TYRP1	GG (n=5): GA (n=254): AA (n=2711): Total (n=2970):	7,20 ng/ml 16,00 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	8,30 ng/ml - 0,50 ng/ml \pm 0,00 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,023
rs12530875	7	106406708	q22.3	upstream	PRKAR2B	AA (n=7): AG (n=259): GG (n=2704): Total (n=2970):	8,20 ng/ml 14,60 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	7,30 ng/ml 0,90 ng/ml - 0,10 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,039
rs16929263	9	12614058	p23	upstream	TYRP1	GG (n=6): GC (n=271): CC (n=2693): Total (n=2970):	8,30 ng/ml 16,60 ng/ml 15,40 ng/ml 15,50 ng/ml	7,20 ng/ml - 1,10 ng/ml 0,10 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,009
rs17342340	9	12598873	p23	upstream	TYRP1	TT (n=6): TA (n=268): AA (n=2696): Total (n=2970):	8,30 ng/ml 16,50 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	7,20 ng/ml - 1,00 ng/ml \pm 0,00 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,011
rs17407577	4	123998791	q27	Intron	FGF2	CC (n=11): CT (n=337): TT (n=2622): Total (n=2970):	8,80 ng/ml 15,10 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	6,70 ng/ml 0,40 ng/ml - 0,10 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,015
rs16950402	15	25711632	q12	Intron	OCA2	CC (n=5): CT (n=195): TT (n=2770): Total (n=2970):	8,80 ng/ml 16,30 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	6,70 ng/ml - 0,80 ng/ml \pm 0,00 ng/ml \pm 0,00 ng/ml	0,027

rs8034368	15	25684763	q12	Intron	OCA2	TT (n=5): TC (n=186): CC (n=2779): Total (n=2970):	8,80 ng/ml 16,50 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	6,70 ng/ml - 1,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,026
rs9328342	6	602729	p25.3	Intron	EXOC2	TT (n=12): TG (n=410): GG (n=2548): Total (n=2970):	9,55 ng/ml 16,30 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	5,95 ng/ml - 0,80 ng/ml ± 0,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,034
rs3794602	15	25948052	q13.1	Intron	OCA2	AA (n=3): AG (n=122): GG (n=2845): Total (n=2970):	12,30 ng/ml 13,45 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	3,20 ng/ml 2,05 ng/ml - 0,10 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,050
rs3829488	15	25950281	q13.1	Intron	OCA2	TT (n=3): TG (n=122): GG (n=2845): Total (n=2970):	12,30 ng/ml 13,45 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	3,20 ng/ml 2,05 ng/ml - 0,10 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,050
rs9314841	9	70823865	q21.11	upstream	PRKACG	AA (n=195): AG (n=1205): GG (n=1570): Total (n=2970):	13,30 ng/ml 15,70 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	2,20 ng/ml - 0,20 ng/ml - 0,10 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,006
rs10830253	11	88667691	q14.3	Intron	TYR	GG (n=255): GT (n=1211): TT (n=1504): Total (n=2970):	13,40 ng/ml 15,40 ng/ml 16,10 ng/ml 15,50 ng/ml	2,10 ng/ml 0,10 ng/ml - 0,60 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,003
rs13314643	3	41114833	p22.1	upstream	CTNNB1	TC (n=116): CC (n=2854): Total (n=2970):	13,45 ng/ml 15,60 ng/ml 15,50 ng/ml	2,05 ng/ml - 0,10 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,025
rs7129973	11	88555218	q14.3	Intron	TYR	GG (n=424): AA (n=1144): GA (n=1402): Total (n=2970):	13,90 ng/ml 15,70 ng/ml 15,90 ng/ml 15,50 ng/ml	1,60 ng/ml - 0,20 ng/ml - 0,40 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,000208
rs4121401	11	88619494	q14.3	Intron	TYR	CC (n=374): CT (n=1342): TT (n=1254): Total (n=2970):	13,90 ng/ml 15,70 ng/ml 16,00 ng/ml 15,50 ng/ml	1,60 ng/ml - 0,20 ng/ml - 0,50 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,000683

rs2000553	11	88575655	q14.3	Intron	TYR	CC (n=419): CT (n=1411): TT (n=1140): Total (n=2970):	14,00 ng/ml 15,90 ng/ml 15,90 ng/ml 15,50 ng/ml	1,50 ng/ml - 0,40 ng/ml - 0,40 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,000457
rs9328331	6	5577061	p25.3	Intron	EXOC2	GG (n=176): CC (n=1672): GC (n=1122): Total (n=2970):	14,10 ng/ml 15,10 ng/ml 16,50 ng/ml 15,5 0 ng/ml	1,40 ng/ml 0,40 ng/ml - 1,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,019
rs12806559	11	68555167	q13.2	upstream	TPCN2	GG (n=95): AA (n=1998): GA (n=877): Total (n=2970):	14,20 ng/ml 15,40 ng/ml 16,20 ng/ml 15,50 ng/ml	1,30 ng/ml 0,10 ng/ml - 0,70 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,048
rs1042602	11	88551344	q14.3	coding Sequence	TYR	AA (n=422): CC (n=1140): AC (n=1408): Total (n=2970):	14,25 ng/ml 15,20 ng/ml 16,10 ng/ml 15,50 ng/ml	1,25 ng/ml 0,30 ng/ml - 0,60 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,014
rs12001326	9	70839372	q21.11	upstream	PRKACG	GG (n=277): GA (n=1349): AA (n=1344): Total (n=2970):	14,30 ng/ml 15,20 ng/ml 16,20 ng/ml 15,50 ng/ml	1,20 ng/ml 0,30 ng/ml - 0,70 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,00144
rs3763609	9	70837230	q21.11	upstream	PRKACG	TT (n=259): TC (n=1325): CC (n=1386): Total (n=2970):	14,40 ng/ml 15,30 ng/ml 16,10 ng/ml 15,50 ng/ml	1,10 ng/ml 0,20 ng/ml - 0,60 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,012
rs271979	20	57433089	q13.32	downstream	EDN3	GA (n=421): GG (n=17): AA (n=2532): Total (n=2970):	14,50 ng/ml 14,80 ng/ml 15,70 ng/ml 15,50 ng/ml	1,00 ng/ml 0,70 ng/ml - 0,20 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,039
rs8003333	14	91904853	q32.12	Intron	SLC24A4	GG (n=107): AA (n=1977): GA (n=886): Total (n=2970):	14,50 ng/ml 15,30 ng/ml 16,30 ng/ml 15,50 ng/ml	1,00 ng/ml 0,20 ng/ml - 0,80 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,030
rs621313	11	88553311	q14.3	Intron	TYR	GG (n=634): AA (n=834): GA (n=1502): Total (n=2970):	14,55 ng/ml 15,15 ng/ml 16,00 ng/ml 15,50 ng/ml	0,95 ng/ml 0,35 ng/ml - 0,50 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,004

rs6070795	20	57424242	q13.32	downstream	EDN3	TT (n=18):	14,65 ng/ml	0,85 ng/ml	0,038
						TG (n=429):	14,70 ng/ml	0,80 ng/ml	
						GG (n=2523):	15,70 ng/ml	- 0,20 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	
rs6064777	20	57428224	q13.32	downstream	EDN3	TT (n=18):	14,65 ng/ml	0,85 ng/ml	0,038
						TC (n=429):	14,70 ng/ml	0,80 ng/ml	
						CC (n=2523):	15,70 ng/ml	- 0,20 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	

Tabelle 11a: Dargestellt sind die im Vorauswahl-Test identifizierten SNPs ($p < 0,05$), die im seltenen Allel im Vergleich zur Gesamtkohorte einen geringeren 25(OH)D-Serumspiegel aufweisen, geordnet vom größten Unterschied ausgehend

Tabelle 11b:

SNP	Chromosom	Position	Bande	Typ	Gen	25(OH)D	Konz. (Median)	Δ 25(OH)D (Total- XX)	P-Wert
rs6123895	20	57434929	q13.32	downstream	EDN3	AA (n=18):	21,80 ng/ml	- 6,30 ng/ml	0,034
						AG (n=461):	15,10 ng/ml	0,40 ng/ml	
						GG (n=2491):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	
rs16872592	6	12409307	p24.1	downstream	EDN1	AA (n= 43):	19,40 ng/ml	- 3,90 ng/ml	0,007
						AG (n=577):	14,80 ng/ml	0,70 ng/ml	
						GG (n=2350):	15,60 ng/ml	- 0,10 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	
rs16872602	6	12409448	p24.1	downstream	EDN1	CC (n=43):	19,40 ng/ml	- 3,90 ng/ml	0,007
						AA (n= 2350):	15,60 ng/ml	- 0,10 ng/ml	
						CA (n=577):	14,80 ng/ml	0,70 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	
rs7356986	6	12412815	p24.1	downstream	EDN1	AA (n= 43):	19,40 ng/ml	- 3,90 ng/ml	0,007
						GG (n=2350):	15,60 ng/ml	- 0,10 ng/ml	
						AG (n=577):	14,80 ng/ml	0,70 ng/ml	
						Total (n=2970):	15,50 ng/ml	± 0,00 ng/ml	

rs389673	3	41070295	p22.1	upstream	CTNNB1	AA (n=52): AG (n=707): GG (n=2211): Total (n=2970):	19,25 ng/ml 15,10 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	- 3,75 ng/ml 0,40 ng/ml ± 0,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,024
rs10747595	12	49508890	q13.13	downstream	ATF1	GT (n=32): TT (n=2938): Total (n=2970):	18,95 ng/ml 15,50 ng/ml 15,50 ng/ml	- 3,45 ng/ml ± 0,00 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,025
rs17652091	15	25945306	q13.1	Intron	OCA2	AA (n=164): AC (n=1057): CC (n=1749): Total (n=2970):	18,25 ng/ml 15,50 ng/ml 15,30 ng/ml 15,50 ng/ml	- 2,75 ng/ml ± 0,00 ng/ml 0,20 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,002
rs10876099	12	49517328	q13.13	downstream	ATF1	CC (n=151): CT (n=1015): TT (n=1804): Total (n=2970):	17,30 ng/ml 15,90 ng/ml 15,20 ng/ml 15,50 ng/ml	- 1,80 ng/ml - 0,40 ng/ml 0,30 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,042
rs16872612	6	12416068	p24.1	downstream	EDN1	CC (n=162): CG (n=1082): GG (n=1726): Total (n=2970):	17,00 ng/ml 14,90 ng/ml 15,75 ng/ml 15,50 ng/ml	- 1,50 ng/ml 0,60 ng/ml - 0,25 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,018
rs7940364	11	68689475	q13.2	downstream	TPCN2	AA (n=440): AG (n=1316): GG (n=1214): Total (n=2970):	16,75 ng/ml 14,90 ng/ml 15,85 ng/ml 15,50 ng/ml	- 1,25 ng/ml 0,60 ng/ml - 0,35 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,024
rs7043787	9	12295664	p23	upstream	TYRP1	AA (n=107): AG (n=947): GG (n=1916): Total (n=2970):	16,40 ng/ml 15,90 ng/ml 15,30 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,90 ng/ml - 0,40 ng/ml 0,20 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,017
rs7203337	16	67332301	q22.1	Intron	CDH1	CC (n=897): GC (n=1536): GG (n=537): Total (n=2970):	16,40 ng/ml 15,00 ng/ml 15,80 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,90 ng/ml 0,50 ng/ml - 0,30 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,031
rs1078621	16	67336497	q22.1	Intron	CDH1	AA (n=897): GA (n=1535): GG (n=538): Total (n=2970):	16,40 ng/ml 15,00 ng/ml 15,75 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,90 ng/ml 0,50 ng/ml - 0,25 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,033

rs3763608	9	70837195	q21.11	upstream	PRKACG	CC (n=559): CT (n=1487): TT(n=924): Total (n=2970):	16,30 ng/ml 15,80 ng/ml 15,00 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,80 ng/ml - 0,30 ng/ml 0,50 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,016
rs1411946	9	12387112	p23	upstream	TYRP1	TT (n=504): TG (n=1393): GG (n=1073): Total (n=2970):	16,35 ng/ml 14,90 ng/ml 16,00 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,85 ng/ml 0,60 ng/ml - 0,50 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,035
rs1411944	9	12386959	p23	upstream	TYRP1	CC (n=504): CT (n=1393): TT (n=1073): Total (n=2970):	16,35 ng/ml 14,90 ng/ml 16,00 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,85 ng/ml 0,60 ng/ml - 0,50 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,035
rs2150097	9	12290716	p23	upstream	TYRP1	GG (n=604): GA (n=1438): AA (n=928): Total (n=2970):	16,20 ng/ml 15,00 ng/ml 16,10 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,70 ng/ml 0,50 ng/ml - 0,60 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,024
rs13078182	3	69760651	p14.1	upstream	MITF	CC (n=1553): AC (n=1179): AA (n=238): Total (n=2970):	15,90 ng/ml 15,10 ng/ml 15,10 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,40 ng/ml 0,40 ng/ml 0,40 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,028
rs17006281	3	69775624	p14.1	upstream	MITF	AA (n=1558): GA (n=1176): GG (n=236): Total (n=2970):	15,90 ng/ml 15,10 ng/ml 15,10 ng/ml 15,50 ng/ml	- 0,40 ng/ml 0,40 ng/ml 0,40 ng/ml ± 0,00 ng/ml	0,028

Tabelle 11b: Dargestellt sind die im Vorauswahl-Test identifizierten SNPs ($p < 0,05$), die im seltenen Allel im Vergleich zur Gesamtkohorte einen höheren 25(OH)D-Serumspiegel aufweisen, geordnet vom größten Unterschied ausgehend

4.3. Chi-Quadrat-Test

Im Chi-Quadrat-Test, bei dem die 46 identifizierten SNPs aus dem Vorauswahl-Test weitergehend analysiert wurden (Aufteilung der Gesamtkohorte in Tertilen), erreichten 24 dieser SNPs einen p-Wert kleiner 0,05. Die Kreuztabellen dieser 24 SNPs sind in den nach folgenden Tabellen dargestellt:

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRP1rs16929263	GG	5	1	0	6	0,030652
	GC	76	96	99	271	
	CC	909	890	894	2693	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 12: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs16929263

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRP1rs17342340	TT	5	1	0	6	0,037562
	TA	76	95	97	268	
	AA	909	891	896	2696	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 13: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs17342340

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
OCA2rs16950402	CC	3	1	1	5	0,033420
	CT	46	75	74	195	
	TT	941	911	918	2770	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 14: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs16950402

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
EXOC2rs9328342	TT	10	0	2	12	0,003771
	TG	130	132	148	410	
	GG	850	855	843	2548	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 15: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EXOC2rs9328342

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
OCA2rs3794602	AA	1	2	0	3	0,015272
	AG	57	33	32	122	
	GG	932	952	961	2845	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 16: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs3794602

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
OCA2rs3829488	TT	1	2	0	3	0,015272
	TG	57	33	32	122	
	GG	932	952	961	2845	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 17: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs3829488

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGr9314841	AA	85	60	50	195	0,022710
	AG	384	410	411	1205	
	GG	521	517	532	1570	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 18: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGr9314841

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs10830253	GG	112	76	67	255	0,000862
	GT	382	431	398	1211	
	TT	496	480	528	1504	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 19: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs10830253

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs7129973	GG	170	137	117	424	0,005050
	AA	387	366	391	1144	
	GA	433	484	485	1402	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 20: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs7129973

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs4121401	CC	152	123	99	374	0,004316
	CT	423	464	455	1342	
	TT	415	400	439	1254	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 21: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs4121401

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs2000553	CC	166	138	115	419	0,010308
	CT	440	484	487	1411	
	TT	384	365	391	1140	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 22: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs2000553

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGrS12001326	GG	110	92	75	277	0,005749
	GA	473	437	439	1349	
	AA	407	458	479	1344	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 23: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGrS12001326

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGrS3763609	TT	100	89	70	259	0,043862
	TC	459	428	438	1325	
	CC	431	470	485	1386	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 24: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGrS3763609

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
SLC24A4rs8003333	GG	43	39	25	107	0,024037
	AA	658	677	642	1977	
	GA	289	271	326	886	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 25: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für SLC24A4rs8003333

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
EDN1rs16872592	AA	8	14	21	43	0,005616
	AG	205	210	162	577	
	GG	777	763	810	2350	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 26: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs16872592

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
EDN1rs16872602	CC	8	14	21	43	0,005616
	AA	777	763	810	2350	
	CA	205	210	162	577	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 27: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs16872602

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
EDN1rs7356986	AA	8	14	21	43	0,005616
	GG	777	763	810	2350	
	AG	205	210	162	577	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 28: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs7356986

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
OCA2rs17652091	AA	42	51	71	164	0,023696
	AC	337	359	361	1057	
	CC	611	577	561	1749	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 29: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs17652091

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
ATF1rs10876099	CC	40	48	63	151	0,037690
	CT	334	321	360	1015	
	TT	616	618	570	1804	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 30: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für ATF1rs10876099

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRP1rs7043787	AA	25	44	38	107	0,039741
	AG	294	324	329	947	
	GG	671	619	626	1916	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 31: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs7043787

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGr3763608	CC	167	189	203	559	0,034142
	CT	484	491	512	1487	
	TT	339	307	278	924	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 32: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGr3763608

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRP1rs2150097	GG	202	187	215	604	0,010710
	GA	495	507	436	1438	
	AA	293	293	342	928	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 33: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs2150097

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
MITFr313078182	CC	484	540	529	1553	0,010560
	AC	429	380	370	1179	
	AA	77	67	94	238	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 34: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für MITFr313078182

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
MITFRs17006281	AA	486	541	531	1558	0,012280
	GA	428	379	369	1176	
	GG	77	67	93	236	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 35: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für MITFRs17006281

4.4. Korrektur für multiples Testen

Die 24 identifizierten SNPs des Chi-Quadrat-Tests wurden nachfolgend mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur auf statistische Signifikanz hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die SNPs mit den 12 niedrigsten p-Werten einen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung ihrer jeweiligen Genotypvariante innerhalb der drei Gruppen der 25(OH)D-Serumkonzentration aufwiesen.

Dies sind die folgenden SNPs: rs10830253 (TYR), rs9328342 (EXOC2), rs4121401 (TYR), rs7129973 (TYR), rs16872592 (EDN1), rs16872602 (EDN1), rs7356986 (EDN1), rs12001326 (PRKACG), rs2000553 (TYR), rs17006281 (MITF), rs2150097 (TYRP1) und rs13078182 (MITF).

Das Benjamini-Hochberg-Korrekturverfahren ist in der Tabelle 36 dargestellt:

Rang	p-Wert	Schranke nach Benjamini-Hochberg	SNP
1	0,000862	0,001087 ($= \frac{0,05}{46}$)	rs10830253 (TYR)
2	0,003771	0,002174 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 2$)	rs9328342 (EXOC2)
3	0,004316	0,003261 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 3$)	rs4121401 (TYR)
4	0,005050	0,004348 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 4$)	rs7129973 (TYR)
5	0,005616	0,005435 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 5$)	rs16872592 (EDN1)
6	0,005616	0,006522 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 6$)	rs16872602 (EDN1)
7	0,005616	0,007609 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 7$)	rs7356986 (EDN1)
8	0,005749	0,008696 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 8$)	rs12001326 (PRKACG)

9	0,010308	0,009783 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 9$)	rs2000553 (TYR)
10	0,010560	0,010870 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 10$)	rs13078182 (MITF)
11	0,010710	0,011957 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 11$)	rs2150097 (TYRP1)
12	0,012280	0,013043 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 12$)	rs17006281 (MITF)
13	0,015272	0,014130 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 13$)	rs3794602 (OCA2)
14	0,015272	0,015217 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 14$)	rs3829488 (OCA2)
15	0,022710	0,016304 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 15$)	rs9314841 (PRKACG)
16	0,023696	0,017391 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 16$)	rs17652091 (OCA2)
17	0,024037	0,018478 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 17$)	rs8003333 (SLC24A4)
18	0,030652	0,019565 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 18$)	rs16929263 (TYRP1)
19	0,033420	0,020652 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 19$)	rs16950402 (OCA2)
20	0,034142	0,021739 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 20$)	rs3763608 (PRKACG)
21	0,037562	0,022826 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 21$)	rs17342340 (TYRP1)
22	0,037690	0,023913 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 22$)	rs10876099 (ATF1)
23	0,039741	0,025000 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 23$)	rs7043787 (TYRP1)
24	0,043862	0,026087 ($= \frac{0,05}{46} \cdot 24$)	rs3763609 (PRKACG)

Tabelle 36: Benjamini-Hochberg Prozedur für alle 24 SNPs, die im Chi-Quadrat-Test einen p-Wert $< 0,05$ hatten. Die ersten 12 SNPs sind nach diesem Verfahren statistisch signifikant.

Die 12 statistisch signifikanten SNPs sind in nachstehender Tabelle (Tabelle 37) noch einmal zusammenfassend aufgetragen. Außerdem sind – soweit bekannt – die von den SNPs veränderten Motive auf der DNS aufgelistet, die aus der HaploRegv2 Datenbank gewonnen wurden [10].

SNP	Chromosom	Position	Bande	Typ	Gen	Genfunktion	veränderte Motive ^[10]
rs9328342	6	602729	p25.3	Intron	EXOC2	Teil eines Proteinkomplexes zur Exozytose	
rs10830253	11	88667691	q14.3	Intron	TYR	Melaninsynthese	HP1-site-factor
rs7129973	11	88555218	q14.3	Intron	TYR	Melaninsynthese	5 veränderte Motive
rs4121401	11	88619494	q14.3	Intron	TYR	Melaninsynthese	KAP1, STAT, p300
rs2000553	11	88575655	q14.3	Intron	TYR	Melaninsynthese	
rs12001326	9	70839372	q21.11	upstream	PRKACG	Teil der Proteinkinase A, Teil der Signaltransduktion der Melanozyten	Sox, Zfp105
rs16872592	6	12409307	p24.1	downstream	EDN1	vasoaktives Peptid, wichtig für die Entwicklung von aus der Neuralleiste stammenden Zellen wie Melanozyten	GR, NF-kappaB
rs16872602	6	12409448	p24.1	downstream	EDN1	vasoaktives Peptid, wichtig für die Entwicklung von aus der Neuralleiste stammenden Zellen wie Melanozyten	AIRE, Ets, Ik-3
rs7356986	6	12412815	p24.1	downstream	EDN1	vasoaktives Peptid, wichtig für die Entwicklung von aus der Neuralleiste stammenden Zellen wie Melanozyten	ATF3, Gmeb1
rs2150097	9	12290716	p23	upstream	TYRP1	Melaninsynthese	8 veränderte Motive
rs13078182	3	69760651	p14.1	upstream	MITF	Teil der Signaltransduktion der Melanozyten	Cphx, Mrg1, Hoxa9, TCF4
rs17006281	3	69775624	p14.1	upstream	MITF	Teil der Signaltransduktion der Melanozyten	Mef2, TCF12

Tabelle 37: Dargestellt sind alle 12 nach dem Chi-Quadrat-Test und dem Korrekturverfahren für multiples Testen statistisch signifikanten SNPs, geordnet vom kleinsten p-Wert ausgehend. Außerdem sind die veränderten Motive auf der DNS aufgelistet.

4.5. Hardy-Weinberg-Equilibrium

Jeder der 12 identifizierten SNPs wurde anschließend auf ein mögliches Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht. Alle SNPs befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen abgebildet. Die Nullhypothese („Es liegt kein Unterschied zwischen den Gruppen vor“, d.h. es liegt ein HWE vor) wird angenommen, wenn das beobachtete χ^2 kleiner als der kritische Wert (χ^2_{krit}) 10,83 ($p < 0,001$) ist.

$\chi^2 = 0.26$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1498.31	1504
Heterozygotes	1222.37	1211
Rare homozygotes	249.31	255

p allele freq = 0.71; q allele freq = 0.29

Tabelle 38: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs10830253 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 1.09$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	2551.85	2548
Heterozygotes	402.29	410
Rare homozygotes	15.85	12

p allele freq = 0.93; q allele freq = 0.07

Tabelle 39: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs9328342 (EXOC2). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 0.26$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1247.69	1254
Heterozygotes	1354.63	1342
Rare homozygotes	367.69	374

p allele freq = 0.65; q allele freq = 0.35

Tabelle 40: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs4121401 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 0.03$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1146.14	1144
Heterozygotes	1397.73	1402
Rare homozygotes	426.14	424

p allele freq = 0.62; q allele freq = 0.38

Tabelle 41: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs7129973 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 1.23$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	2344	2350
Heterozygotes	589	577
Rare homozygotes	37	43

p allele freq = 0.89; q allele freq = 0.11

Tabelle 42: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs16872592 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 1.23$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	2344	2350
Heterozygotes	589	577
Rare homozygotes	37	43

p allele freq = 0.89; q allele freq = 0.11

Tabelle 43: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs16872602 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 1.23$
(2970 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	2344	2350
Heterozygotes	589	577
Rare homozygotes	37	43

p allele freq = 0.89; q allele freq = 0.11

Tabelle 44: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs7356986 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$$\chi^2 = 5.5$$

(2970 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1371.83	1344
Heterozygotes	1293.34	1349
Rare homozygotes	304.83	277

p allele freq = 0.68; q allele freq = 0.32

Tabelle 45: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs12001326 (PRKACG). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$$\chi^2 = 0.28$$

(2970 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1146.76	1140
Heterozygotes	1397.48	1411
Rare homozygotes	425.76	419

p allele freq = 0.62; q allele freq = 0.38

Tabelle 46: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs2000553 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$$\chi^2 = 0.46$$

(2970 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1545.56	1553
Heterozygotes	1193.88	1179
Rare homozygotes	230.56	238

p allele freq = 0.72; q allele freq = 0.28

Tabelle 47: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs13078182 (MITF). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$$\chi^2 = 1.19$$

(2970 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	913.34	928
Heterozygotes	1467.33	1438
Rare homozygotes	589.34	604

p allele freq = 0.55; q allele freq = 0.45

Tabelle 48: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs2150097 (TYRP1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

$\chi^2 = 0.46$
 (2970 samples counted)
 for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	1550.61	1558
Heterozygotes	1190.78	1176
Rare homozygotes	228.61	236

p allele freq = 0.72; q allele freq = 0.28

Tabelle 49: Test auf HWE. Kreuztabelle für rs17006281 (MITF). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist

4.6. Allelbasierte Test

Die drei anschließend durchgeführten allelbasierten Testreihen zeigten folgende Ergebnisse: Im rezessiven Modell der allelbasierten Tests erreichten folgende SNPs p-Werte $< 0,05$: rs10830253 (TYR), rs9328342 (EXOC2), rs4121401 (TYR), rs7129973 (TYR), rs12001326 (PRKACG), rs2000553 (TYR), rs13078182 (MITF) und rs17006281 (MITF). Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

	Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
	<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs10830253rezessiv G	112	76	67	255	0,001
T	878	911	926	2715	
Gesamt	990	987	993	2970	

Tabelle 50: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs10830253 (TYR), G-Allel rezessiv

	Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
	<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs4121401rezessiv C	152	123	99	374	0,001
T	838	864	894	2596	
Gesamt	990	987	993	2970	

Tabelle 51: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs4121401 (TYR), C-Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
EXOC2rs9328342rezessiv	T	10	0	2	12	0,001
	G	980	987	991	2958	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 52: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs9328342 (EXOC2), T-Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p- Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs7129973rezessiv	G	170	137	117	424	0,003
	A	820	850	876	2546	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 53: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs7129973 (TYR), G-Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGrs12001326 rezessiv	G	110	92	75	277	0,024
	A	880	895	918	2693	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 54: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs12001326 (PRKACG), G-Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs2000553rezessiv	C	166	138	115	419	0,004
	T	824	849	878	2551	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 55: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs2000553 (TYR), C- Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
MITFrs13078182rezessiv	C	484	540	529	1553	0,026
	A	506	447	464	1417	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 56: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs13078182 (MITF), C- Allel rezessiv

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
MITFrs17006281rezessiv	A	486	541	531	1558	0,029
	G	504	446	462	1412	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 57: Ergebnisse des rezessiven Tests für rs17006281 (MITF), A-Allel rezessiv

Im dominanten Modell der allelbasierten Tests fanden sich für die SNPs rs12001326 (PRKACG) und rs2150097 (TYRP1) p-Werte < 0,05:

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGrs12001326 dominant	G	583	529	514	1626	0,004
	A	407	458	479	1344	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 58: Ergebnisse des dominanten Tests für rs12001326 (PRKACG), G-Allel dominant

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRP1rs2150097dominant	G	697	694	651	2042	0,029
	A	293	293	342	928	
Gesamt		990	987	993	2970	

Tabelle 59: Ergebnisse des dominanten Tests für rs2150097 (TYRP1), G-Allel dominant

Im multiplikativen Modell der allelbasierten Tests erreichten die SNPs rs4121401 (TYR) und rs12001326 (PRKACG) p-Werte < 0,05.

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
TYRrs4121401	C	727	710	653	2090	0,027
	T	1253	1264	1333	3850	
Gesamt		1980	1974	1986	5940	

Tabelle 60: Ergebnisse des multiplikativen Tests für rs4121401 (TYR)

		Gruppen 25(OH)D			Gesamt	p-Wert
		<11,80	11,80 - 20,10	>20,10		
PRKACGrs12001326	G	693	621	589	1903	0,001
	A	1287	1353	1397	4037	
Gesamt		1980	1974	1986	5940	

Tabelle 61: Ergebnisse des multiplikativen Tests für rs12001326 (PRKACG)

Für jeden SNP wurde dasjenige Testmodell, das den niedrigsten p-Wert aufwies, als das ausschlaggebende angesehen (Tabelle 62).

SNP	allelbasiertes Testmodell		
	multiplikatives Modell	dominantes Modell	rezessives Modell
rs10830253 (TYR)	0,024	0,119	0,001
rs9328342 (EXOC2)	0,431	0,542	0,001
rs4121401 (TYR)	0,027	0,246	0,001
rs7129973 (TYR)	0,155	0,521	0,003
rs16872692 (EDN1)	0,204	0,054	0,051
rs16872602 (EDN1)	0,204	0,054	0,051
rs7356986 (EDN1)	0,204	0,054	0,051
rs12001326 (PRKACG)	0,001	0,004	0,024
rs2000553 (TYR)	0,134	0,521	0,004
rs13078182 (MITF)	0,055	0,085	0,026
rs2150097 (TYRP1)	0,520	0,029	0,326
rs17006281 (MITF)	0,066	0,098	0,029

Tabelle 62: Übersicht über die p-Werte der allelbasierten Tests der 12 identifizierten SNPs

4.7. Erklärte Varianz

Als nächstes wurde das Bestimmtheitsmaß (Determinationskoeffizient, Abkürzung R^2 bzw. B), mit dem abgeschätzt werden kann, welcher Anteil der Varianz der 25(OH)D-Serumkonzentration von den identifizierten SNPs erklärt wird, berechnet. Das Bestimmtheitsmaß für die 12 gefundenen statistisch signifikanten SNPs beträgt zusammen 1,8 %, während das Bestimmtheitsmaß für die 46 SNPs, die im Vorauswahl-Test identifiziert wurden, zusammen 5,6 % beträgt.

4.8. Adjustierung

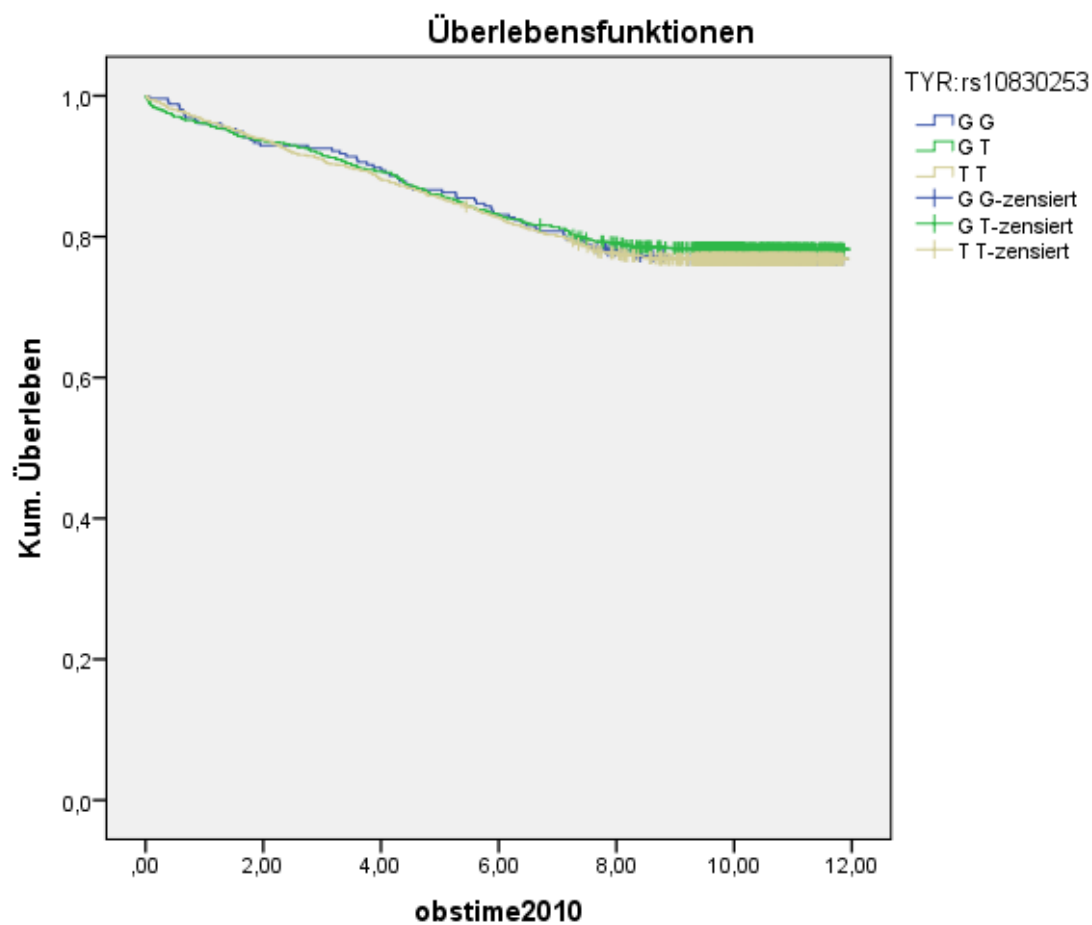
Nach Adjustierung der 12 SNPs für Geschlecht, BMI, Monat der Blutabnahme und Geburtsjahr konnten folgende 3 SNPs ihre statistische Signifikanz beibehalten: rs2150097 (TYRP1), rs7356986 (EDN1) und rs12001326 (PRKACG). Die Ergebnisse der Adjustierung (multiple lineare Regression) sind in der Tabelle 63 dargestellt. Der SNP rs16872602 (EDN1) wurde vom SPSS-Programm aus der Berechnung ausgeschlossen.

	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.
	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Beta		
(Konstante)	-11,705	1,858		-6,301	0,000
Geschlecht	-0,171	0,022	-0,135	-7,701	0,000
BMI (kg/m ²)	-0,006	0,003	-0,044	-2,498	0,013
Monat der Blutentnahme	0,035	0,003	0,210	12,040	0,000
Geburtsjahr	0,007	0,001	0,133	7,550	0,000
TYRrs10830253	-0,014	0,022	-0,016	-0,641	0,522
EXOC2rs9328342	0,032	0,029	0,020	1,128	0,259
TYRrs4121401	0,025	0,025	0,029	0,987	0,324
TYRrs7129973	0,071	0,063	0,088	1,139	0,255
EDN1rs7356986	0,059	0,024	0,043	2,454	0,014
PRKACGrs12001326	0,048	0,016	0,054	3,079	0,002
TYRrs2000553	-0,038	0,062	-0,047	-0,614	0,539
MITFr13078182	0,069	0,115	0,073	0,598	0,550
TYRP1rs2150097	0,032	0,011	0,049	2,802	0,005
MITFr17006281	-0,018	0,115	-0,019	-0,153	0,878

Tabelle 63: Ergebnisse der Adjustierung (multiple lineare Regression)

4.9. Überlebenszeitanalyse

Die zum Schluss durchgeführte Überlebenszeitanalyse, bei der mit Hilfe eines Log- Rank-Test (Mantel-Cox) der Einfluss der einzelnen 12 identifizierten statistisch signifikanten SNPs auf das Überleben der Patienten betrachtet wurde, ergab keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil zwischen den drei möglichen Genotypvarianten. Die Ergebnisse wurden in Kaplan-Meier-Kurven veranschaulicht, die im Folgenden aufgeführt sind.

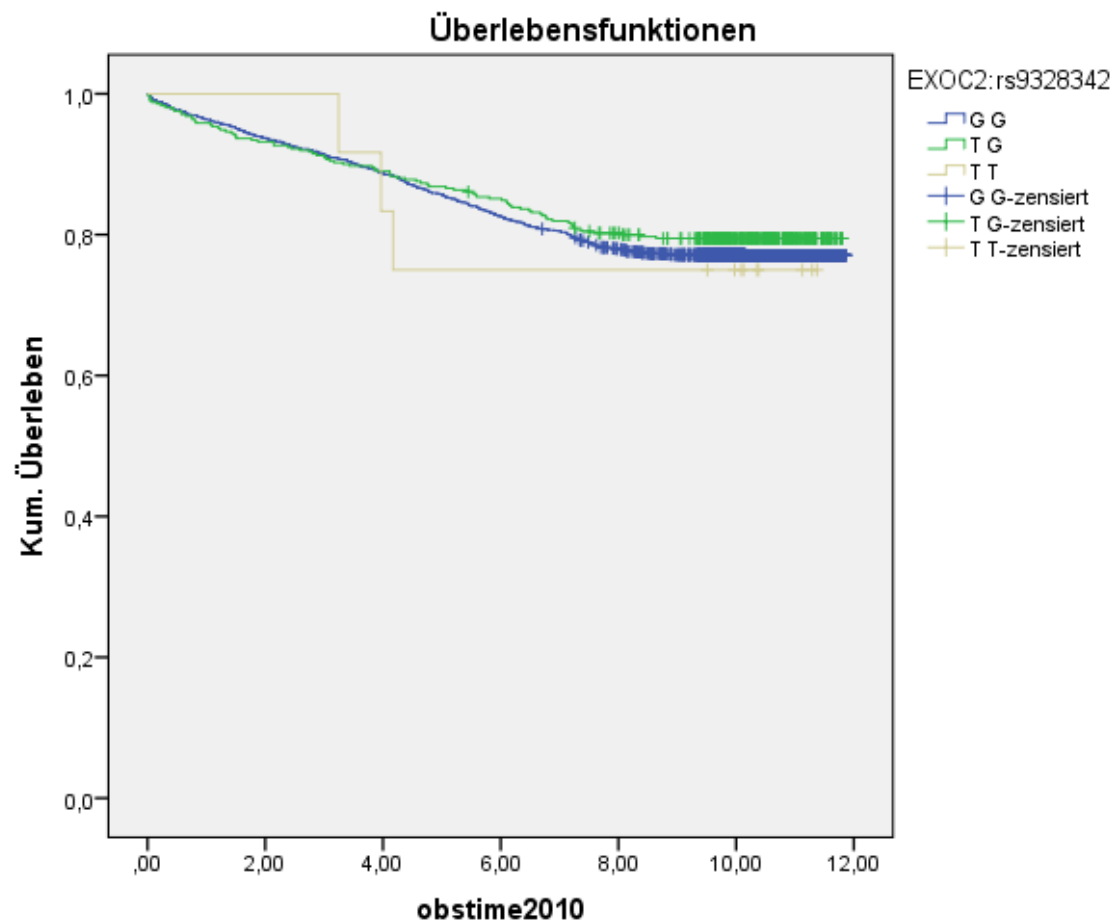


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,713	2	0,700

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von TYR:rs10830253.

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für rs10830253 (TYR)

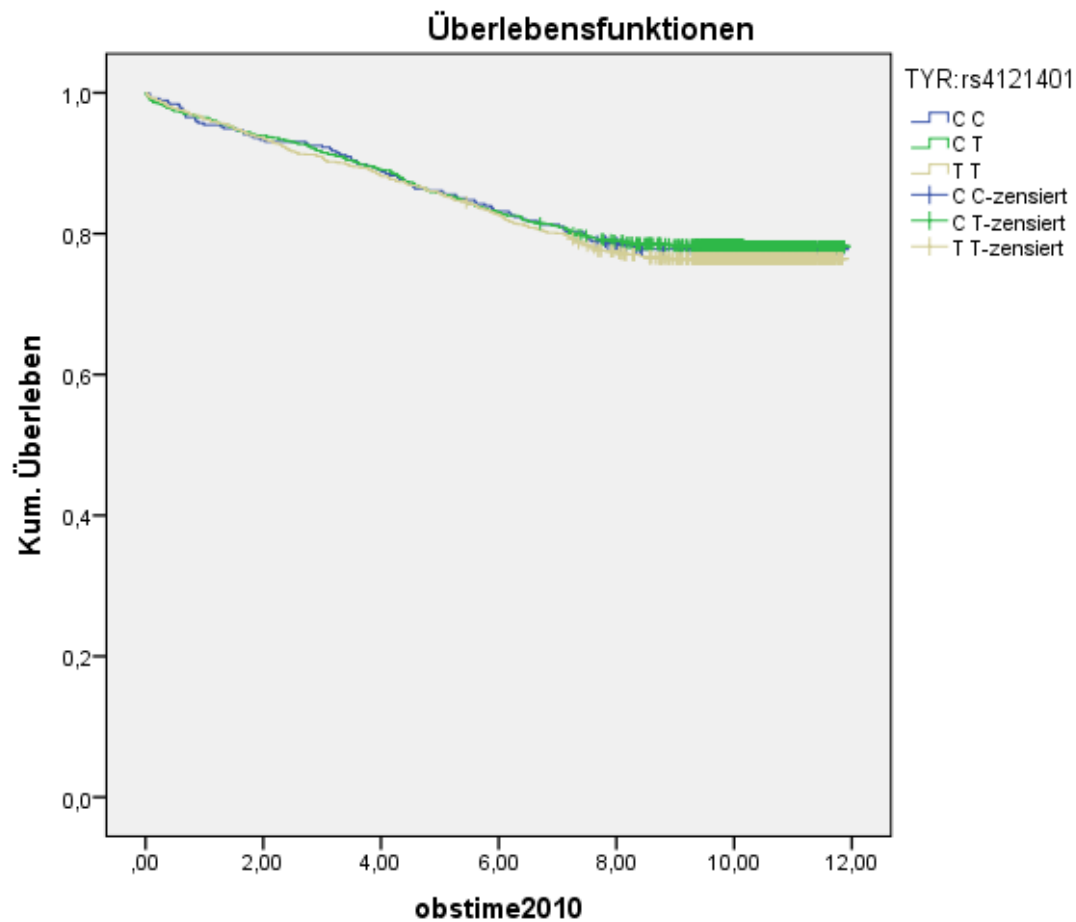


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,030	2	0,597

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von EXOC2:rs9328342.

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve für rs9328342 (EXOC2)

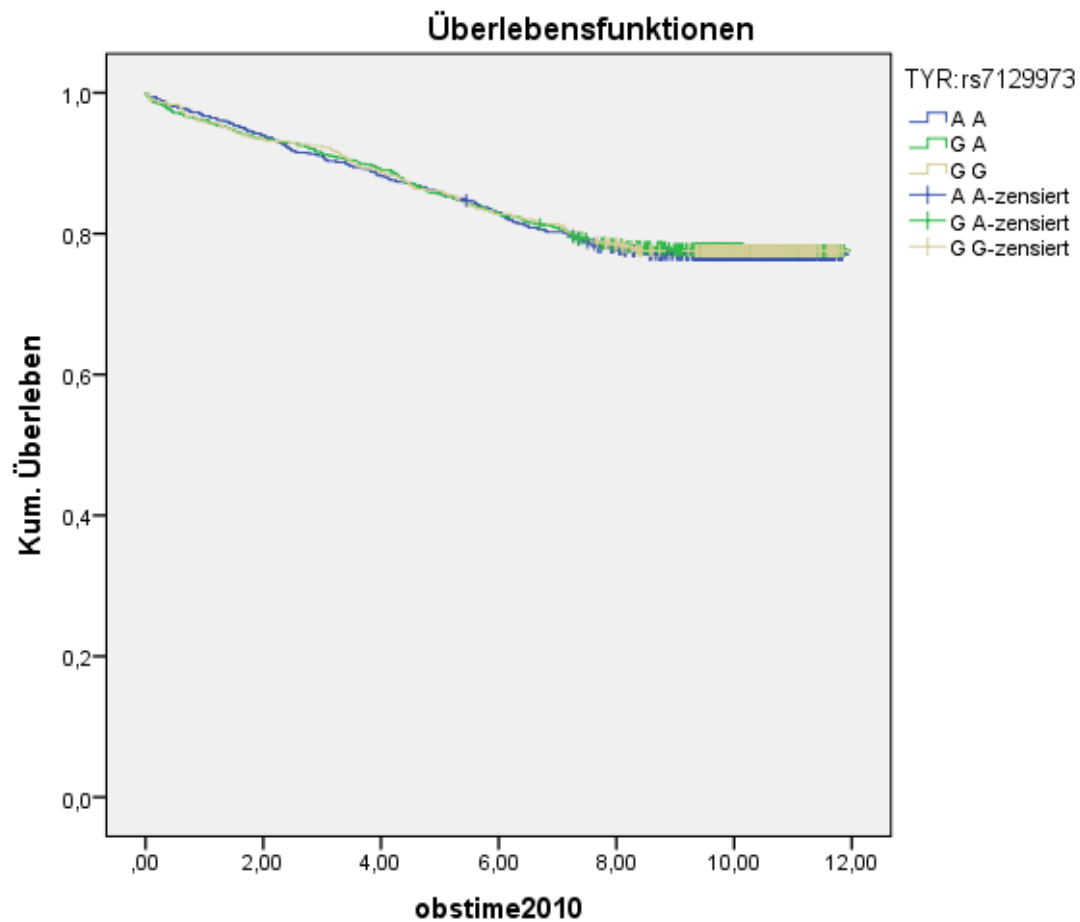


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,078	2	0,583

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von TYR:rs4121401.

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve für rs4121401 (TYR)

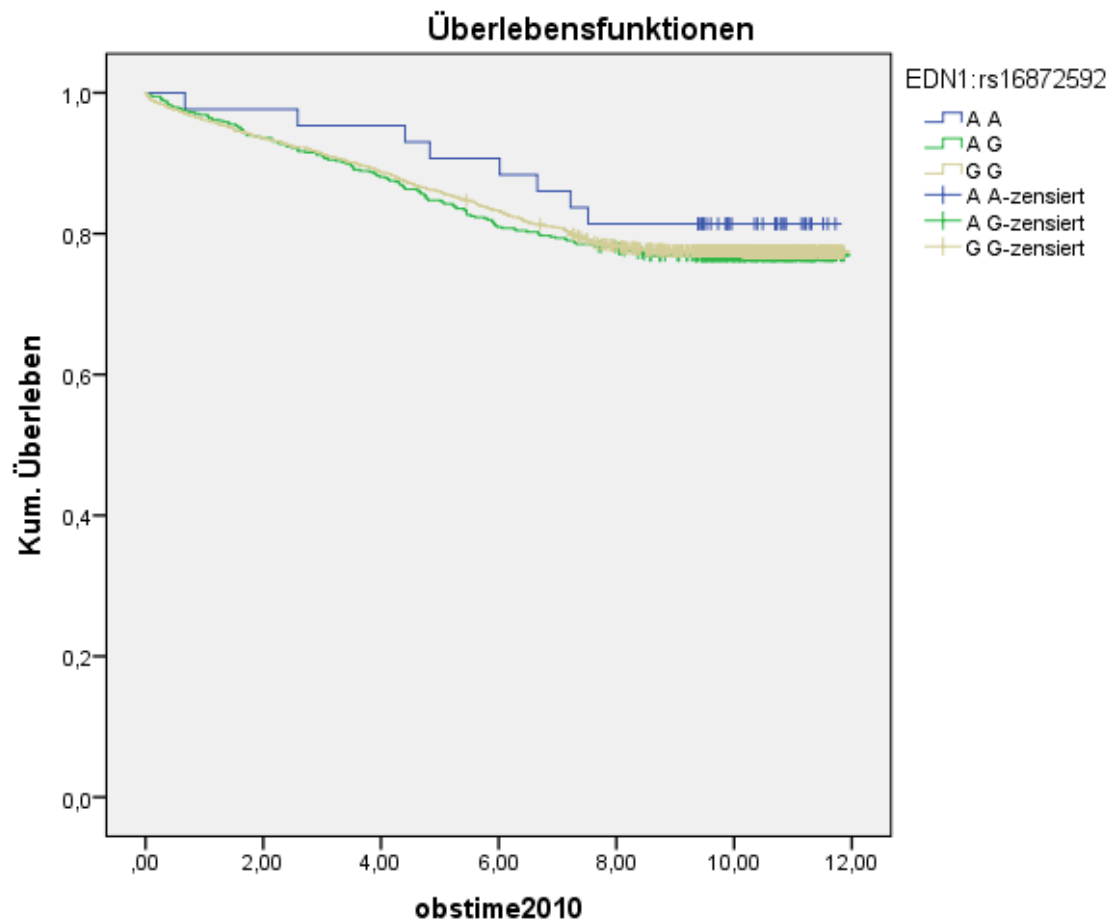


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,111	2	0,946

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von TYR:rs7129973.

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für rs7129973 (TYR)

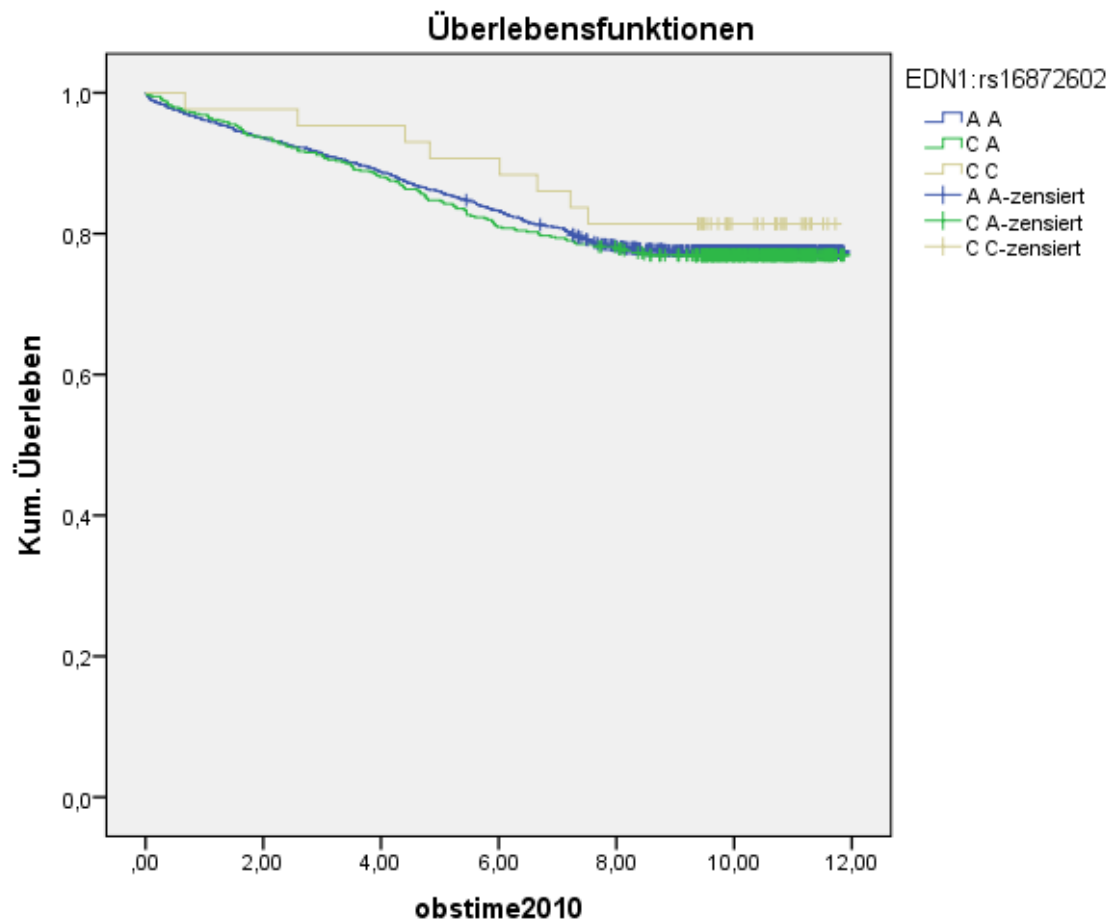


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,581	2	0,748

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von EDN1:rs16872592.

Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve für rs16872592 (EDN1)

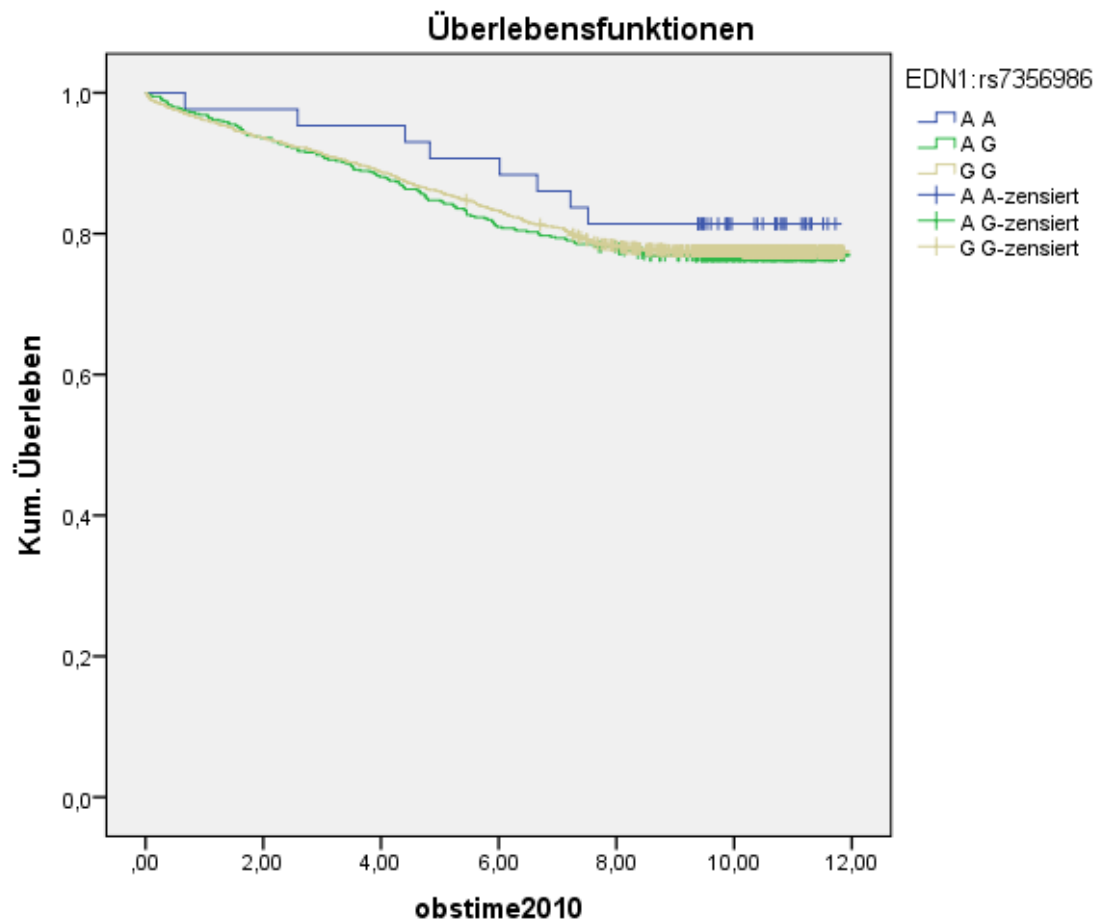


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,581	2	0,748

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von EDN1:rs16872602.

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für rs16872602 (END1)

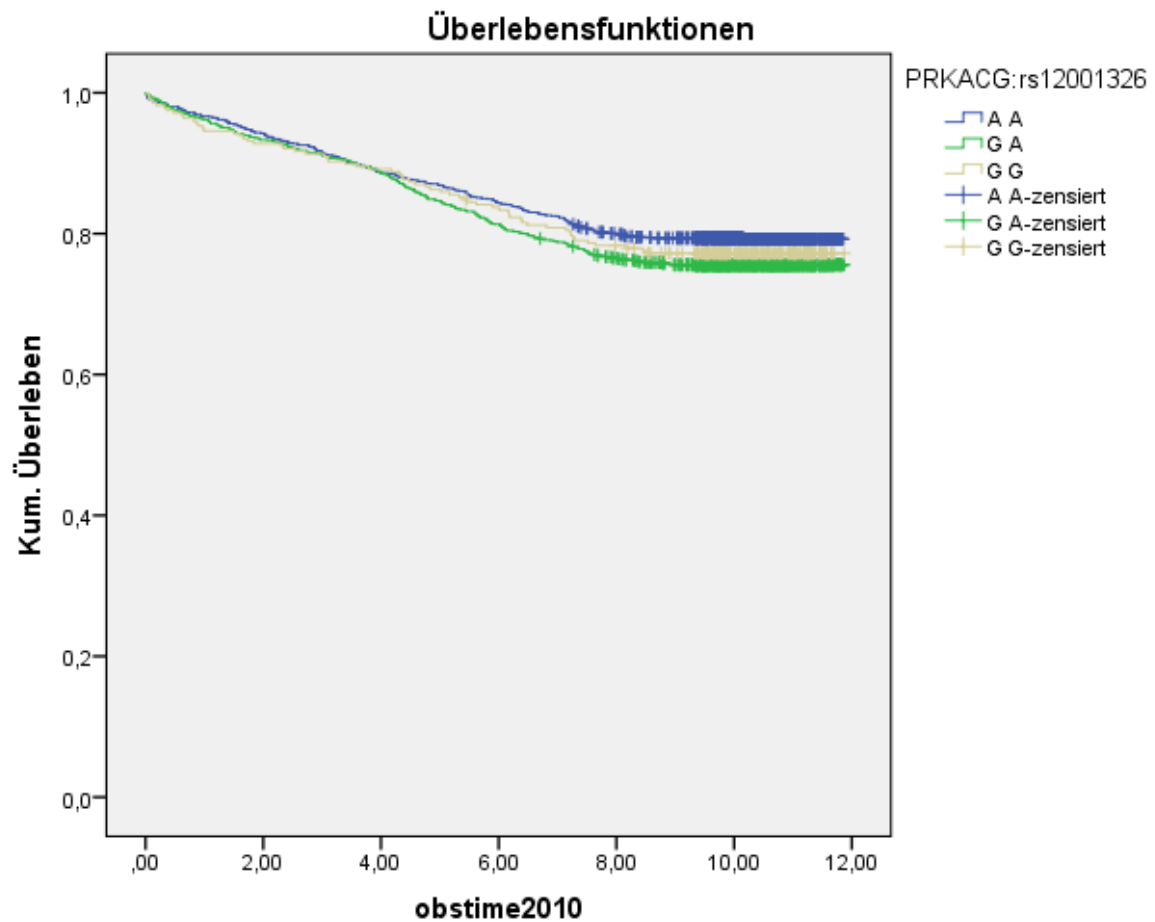


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,581	2	0,748

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von EDN1:rs7356986.

Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve für rs7356986 (EDN1)

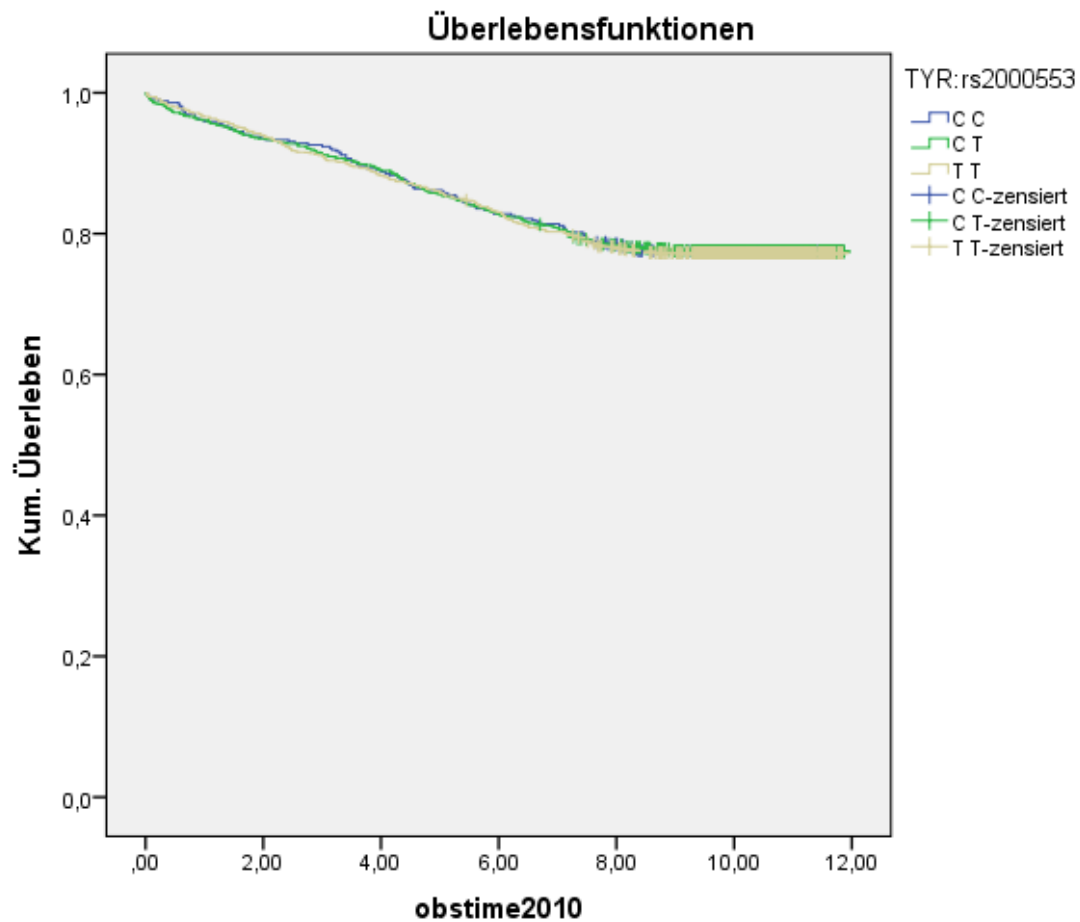


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,036	2	0,081

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von PRKACG:rs12001326.

Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für rs12001326 (PRKACG)

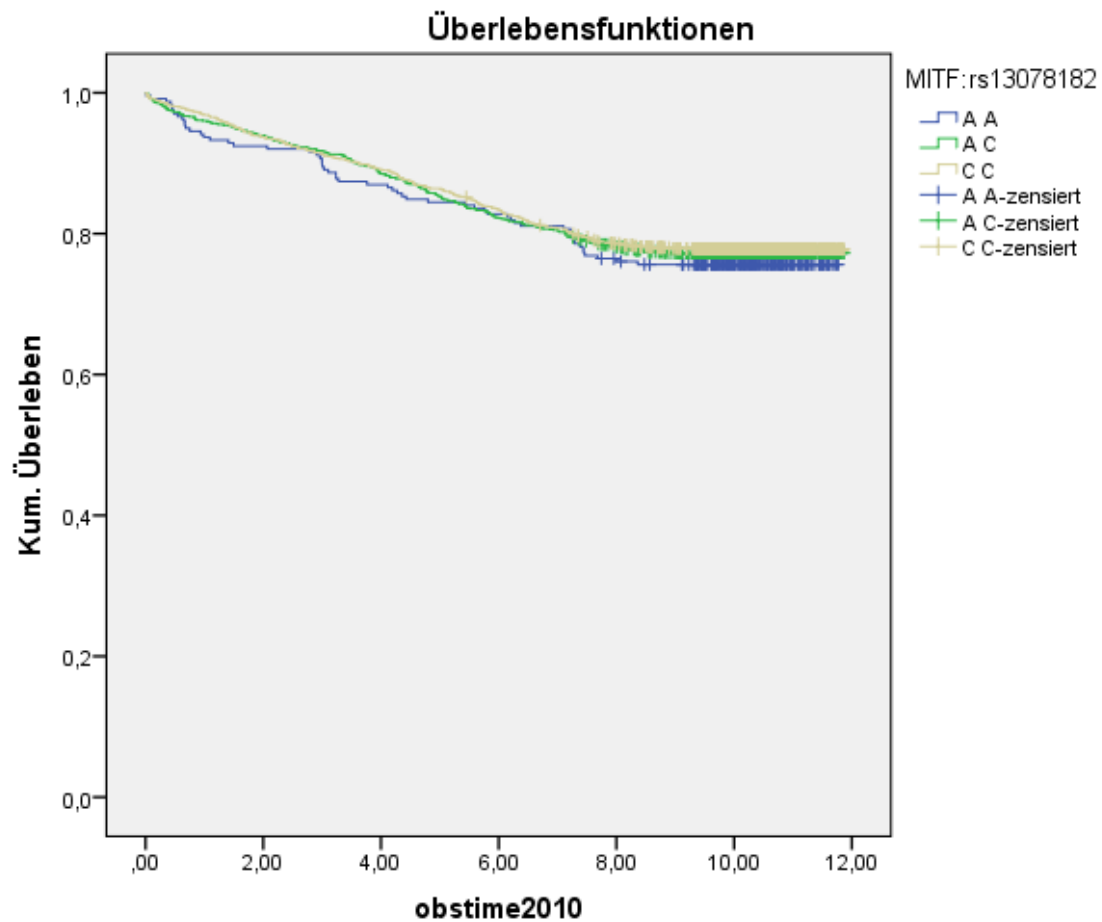


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,028	2	0,986

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von TYR:rs2000553.

Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für rs2000553 (TYR)

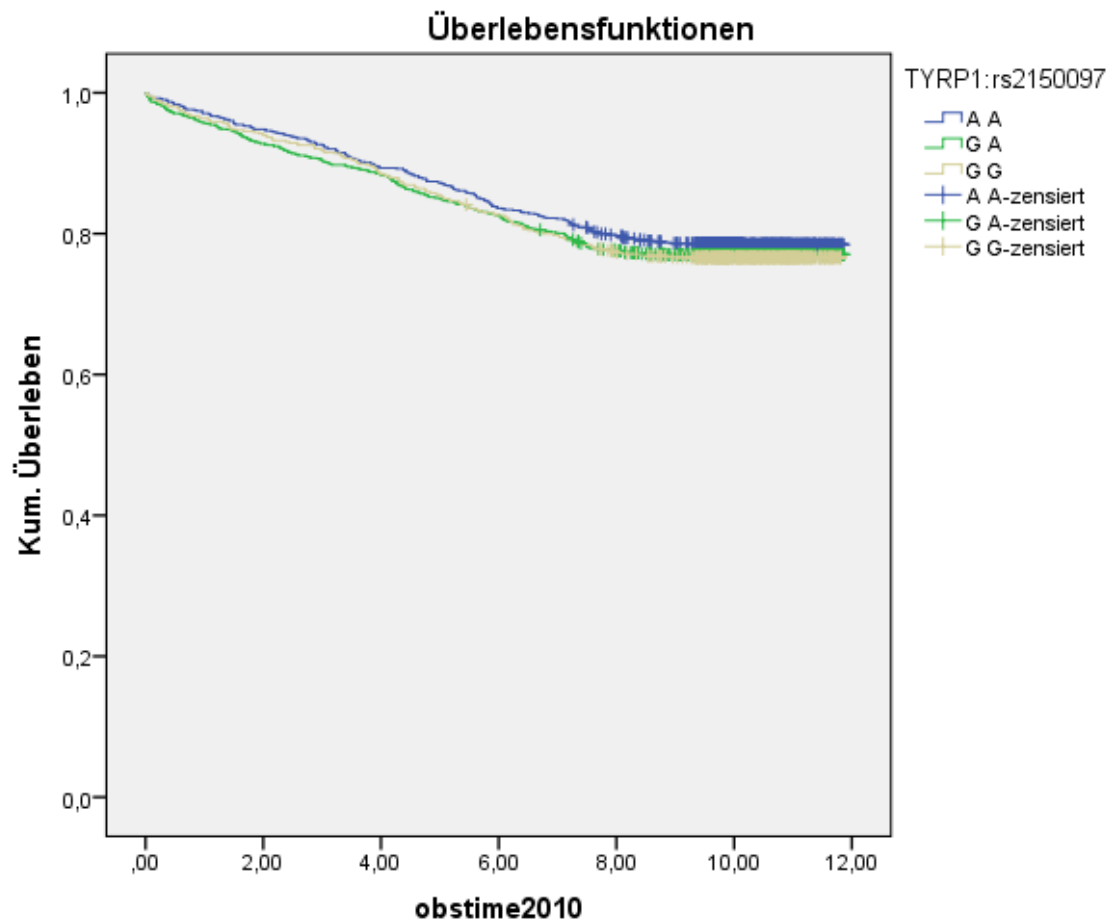


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,651	2	0,722

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von MITF:rs13078182.

Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für rs13078182 (MITF)

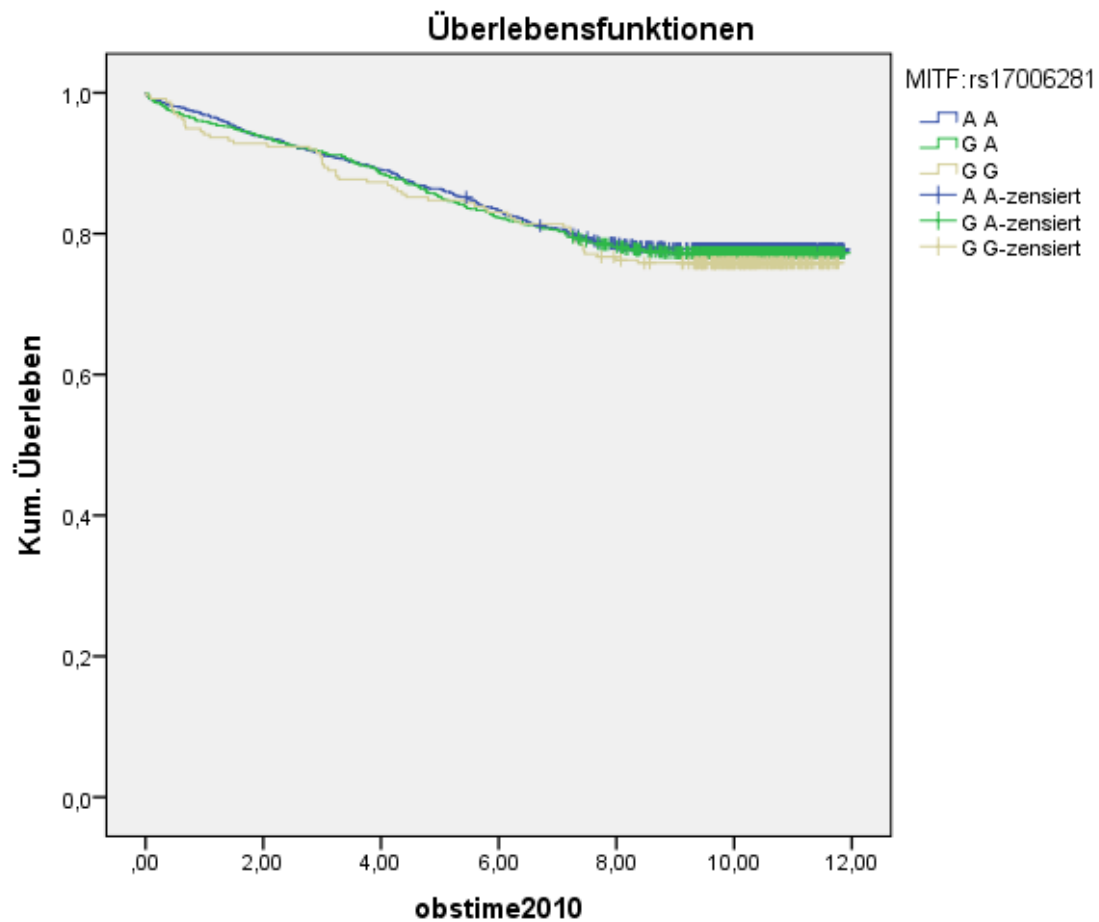


Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,181	2	0,554

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von TYRP1:rs2150097.

Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für rs2150097 (TYRP1)



Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,485	2	0,785

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von MITF:rs17006281.

Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve für rs17006281 (MITF)

Auch in der Cox-Analyse fand sich kein statistisch signifikanter Einfluss eines SNPs auf das Überleben. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 64 dargestellt.

	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
EXOC2rs9328342			1,009	2	0,604	
EXOC2rs9328342(1)	0,007	0,199	0,001	1	0,971	1,007
EXOC2rs9328342(2)	-0,108	0,207	0,272	1	0,602	0,898
TYRrs10830253			0,210	2	0,900	
TYRrs10830253(1)	0,069	0,153	0,206	1	0,650	1,072
TYRrs10830253(2)	-0,023	0,090	0,067	1	0,796	0,977
TYRrs7129973			0,670	2	0,715	
TYRrs7129973(1)	0,243	0,342	0,508	1	0,476	1,276
TYRrs7129973(2)	-0,117	0,230	0,257	1	0,612	0,890
TYRrs4121401			1,354	2	0,508	
TYRrs4121401(1)	-0,107	0,165	0,418	1	0,518	0,899
TYRrs4121401(2)	-0,044	0,099	0,198	1	0,656	0,957
TYRrs2000553			1,194	2	0,550	
TYRrs2000553(1)	0,174	0,378	0,212	1	0,645	1,190
TYRrs2000553(2)	0,152	0,227	0,447	1	0,504	1,164
PRKACGrs12001326			5,021	2	0,081	
PRKACGrs12001326(1)	-0,093	0,061	2,314	1	0,128	0,911
PRKACGrs12001326(2)	0,090	0,060	2,272	1	0,132	1,094
TYRPs1rs2150097			1,238	2	0,538	
TYRPs1rs2150097(1)	-0,064	0,058	1,221	1	0,269	0,938
TYRPs1rs2150097(2)	0,026	0,052	0,244	1	0,621	1,026
EDN1rs16872592			0,421	2	0,810	
EDN1rs16872592(1)	-0,150	0,238	0,394	1	0,530	0,861
EDN1rs16872592(2)	0,085	0,132	0,415	1	0,519	1,089
EDN1rs7356986			.	0 ^a	.	
EDN1rs16872602			.	0 ^a	.	
MITFr13078182			1,721	2	0,423	
MITFr13078182(1)	0,767	0,646	1,409	1	0,235	2,154
MITFr13078182(2)	-0,051	0,382	0,018	1	0,893	0,950
MITFr17006281			1,493	2	0,474	
MITFr17006281(1)	0,672	0,557	1,456	1	0,228	1,958
MITFr17006281(2)	0,036	0,384	0,009	1	0,925	1,037

Tabelle 64: Ergebnisse der Cox-Analyse

4.10. Schematische Übersicht

In der Abbildung 19 sind die einzelnen Analyseschritte noch einmal schematisch in einer Übersicht zusammengefasst.

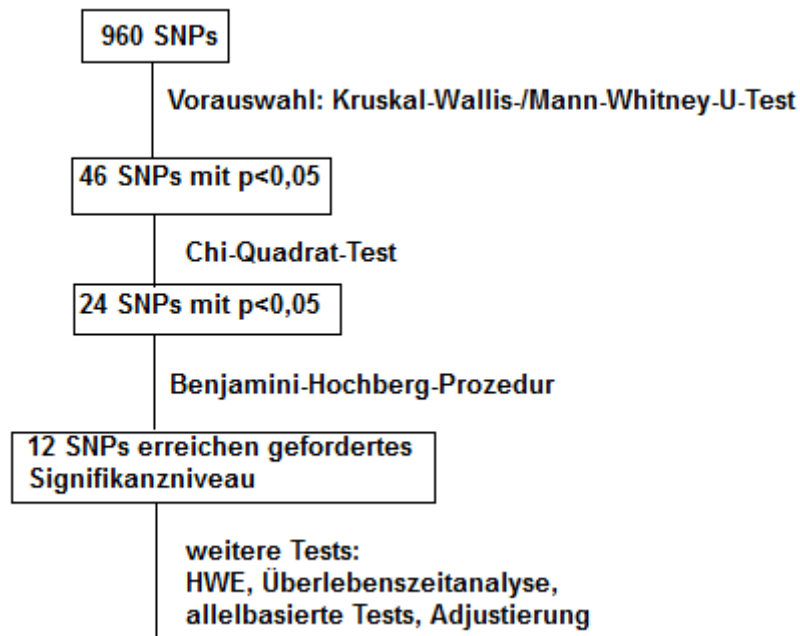


Abbildung 19: Schematische Zusammenfassung der durchgeführten Analyseschritte

5. Diskussion

Aufgrund der stark ausgeprägten Mangelsituation von 25(OH)D in der Bevölkerung und angesichts der wesentlichen Erweiterung des Verständnis in den letzten Jahren über die Bedeutung dieses Mangels als Risikofaktor für zahlreiche Erkrankungen, ist es von großem Interesse Faktoren zu finden, die den Vitamin D-Status beeinflussen. Einer dieser Faktoren ist die Hautpigmentierung. Es ist bereits bekannt, dass dunkelhäutige Menschen, die außerhalb der Äquatorregionen leben, einen niedrigeren Vitamin D-Spiegel aufweisen [38]. Allerdings sind noch relativ wenige Polymorphismen – insbesondere wenige Varianten in Genen, die die Hautpigmentierung beeinflussen – bekannt, die direkte Auswirkungen auf den 25(OH)D-Status haben. Die Fragestellung dieser Arbeit lag darin, erstmals in einem ausgewählten Kollektiv, in dem alle Patienten kaukasischer Herkunft waren, zu untersuchen, inwieweit SNPs, die in Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung liegen, Auswirkungen auf den 25(OH)D-Status haben. Der Gedanke dabei war, dass einige dieser Polymorphismen die Hautpigmentierung innerhalb der kaukasischen Bevölkerung derart beeinflussen könnten, dass es zu einer erhöhten oder verminderten 25(OH)D-Konzentration im Serum kommt. In dieser Patientenkohorte konnte eine Assoziation von bestimmten SNPs mit Bedeutung für die Hautpigmentierung mit der 25(OH)D-Serumkonzentration nachgewiesen werden.

Variationen der menschlichen Hautpigmentierung und Haarfarbe sind einer der auffälligsten Aspekte der menschlichen Vielseitigkeit [69]. Das Zustandekommen dieser Vielseitigkeit und ihre Entwicklung im Rahmen der Evolution zu erklären ist eine der zentralen Fragen der Humanbiologie [69]. Seit einigen Jahren ist es möglich diese Fragen experimentell unter Verwendung populationsgenetischer Ansätze zu klären [69]. Auf Basis früherer Studien an Mäusen aber auch mit GWAS wurden viele Gene, die für die Variationen der Hautfarbe verantwortlich sind, identifiziert [69]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse, wurden in dieser Arbeit 960 SNPs aus 29 verschiedenen Genregionen mit Bezug zur Hautpigmentierung ausgewählt. Über diese Gene ist bereits bekannt, dass sie bestimmte Aspekte der Hautpigmentierung wie z.B. die Melaninsynthese (TYR, TYRP1, DCT), den Tyrosintransport (OCA2), den Signalweg innerhalb der Melanozyten (PRKAR2B) und die Melanozytenentwicklung (FGF2, EDN3, CTNNB1) u.a. regulieren.

Eine Theorie zur Erklärung, wie die Vielseitigkeit der Hautpigmentierung im Laufe der Evolution zustande gekommen ist, basiert nicht zuletzt auf dem Vitamin D [38]. Es wird angenommen, dass in der Fähigkeit zur Vitamin D-Synthese ein möglicher evolutionärer Mechanismus bei der Entstehung der verschiedenen Hautfarben liegt [38]. Die ersten Vorfahren des modernen Menschen lebten in Afrika in der Nähe des Äquators und hatten

noch die dunkle Hautpigmentierung ihrer Vorfahren [38]. Die hohe Melaninkonzentration in der Haut der Vorfahren war so dosiert, dass das Melanin als Sonnenschutzmittel vor Hautkrebs schützte, aber dennoch genügend UV-Licht in die Hautschichten vordringen konnte, um für die Vitamin D-Produktion zur Verfügung zu stehen [38]. Als einige Gruppen weiter nach Norden bzw. Süden auswanderten, entfernten sie sich von der hohen Sonnenintensität des Äquators [38]. Mit der Entfernung vom Äquator nahm auch die Intensität der UV-Strahlung ab und damit gleichsam die effektive Vitamin D-Produktion [38]. Wahrscheinlich führte dies zu einem Vitamin D-Mangel und somit auch zu den noch heute bekannten klinischen Symptomen wie Skelettfehlbildungen [38]. Insbesondere bei Frauen resultierte daraus ein kleineres Becken, was Geburten erschwerte [38]. Insgesamt waren die Menschen also gezwungen sich an die neuen Lebensverhältnisse anzupassen und im Laufe der Generationen eine hellere Hautpigmentierung anzunehmen [38]. Dies geschah nach einer Theorie durch eine positive Selektion, bei der Mutationen, die zu einer helleren Haut führen, bevorzugt wurden [42]. Dieser evolutionäre Prozess konnte z.B. bei Neandertalern nachgewiesen werden, die eine Mutation im Rezeptor des melanozytenstimulierenden Hormons hatten, der ihnen eine rote Haarfarbe und einen keltischen Hauttyp verlieh [38, 49].

In diesem Kontext trägt die vorliegende Arbeit dazu bei die Theorie zu unterstützen, dass die Vielfalt der Hautpigmentierung über die Effekte der 25(OH)D-Serumkonzentration einen Beitrag zur Evolution des Menschen darstellt. Es wurde hier gezeigt, dass SNPs in Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung, die 25(OH)D-Serumkonzentration der kaukasischen Bevölkerung mit beeinflussen können. Diese Ergebnisse leisten einen Beitrag, die Wechselwirkungen des Sonnenlichts, der Hautpigmentierung, der Evolution des Menschen und des Vitamin D besser zu verstehen.

Über andere Faktoren, die den 25(OH)D-Serumspiegel beeinflussen können, sind schon SNPs bekannt, die mit dem 25(OH)D-Status assoziiert sind: Im Jahr 2010 wurden häufig vorkommende genetische Faktoren für die Vitamin D-Insuffizienz im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) identifiziert [91]. In dieser Arbeit erreichten drei Genloci in der sogenannten Discovery Kohorte eine genomweite Signifikanz für die Assoziation mit der Konzentration von 25(OH)D im Serum. Die gefundene Signifikanz dieser Loci wurde in der sogenannten Replication Kohorte bestätigt: 4p12 mit einem p-Wert von $1,9 \times 10^{-109}$ für den SNP rs2282679 im GC-Gen; 11q12 mit einem p-Wert von $2,1 \times 10^{-27}$ für den SNP rs12785878 in der Nähe des DHCR7- Gens und 11p15 mit einem p-Wert von $3,3 \times 10^{-20}$

für den SNP rs10741657 in der Nähe des CYP2R1-Gens [91]. Probanden mit einem Genotypscore (Kombination der drei bestätigten Loci) zeigten im obersten Quartil ein erhöhtes Risiko eine 25(OH)D-Serumkonzentration niedriger als 75 nmol/L (Odds Ratio= 2,47, 95%- Konfidenzintervall= 2,20-2,78, $p=2,3 \times 10^{-48}$) oder niedriger als 50 nmol/L (OR 1,92, 95% KI 1,70-2,16, $p=1,0 \times 10^{-26}$) im untersten Quartil zu haben [91]. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass genetische Variationen in der Nähe von Genen, deren Genprodukte in die Cholesterolsynthese, die Hydroxylierung und den Vitamin D-Transport eingebunden sind, den Vitamin D-Status eines Individuums beeinflussen können [91]. Die Autoren wiesen darauf hin, dass die genetischen Variationen an diesen drei Loci Personen identifizieren können, die ein erheblich erhöhtes Risiko für einen Vitamin D-Mangel aufweisen [91]. Aufgrund des großen Patientenkollektivs hatte die Wang- Studie ausgezeichnete Voraussetzungen SNPs zu identifizieren, die einen Einfluss auf den Vitamin D-Spiegel haben. Dennoch ist zu erwarten, dass viele relevante SNPs entgangen sind, da Einschränkungen der GWAS, wie z.B. die Durchführung einer zu konservativen Datenauswertung und die Tatsache, dass die gesammelten Daten aus einer heterogenen Kohorte stammen, zu einem Fehler 2. Art führen können. Ein Fehler 2. Art führt dazu, dass einige existierende Assoziationen übersehen werden (falsch-negative). SNPs in Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung, also auch die in dieser Arbeit identifizierten SNPs, wurden in der Wang-Studie nicht beschrieben. Im Gegensatz zur Wang-Arbeit, in der die Daten von einer heterogenen Population analysiert wurden [91], liegt eine Stärke der vorliegenden Arbeit in der Homogenität des Patientenkollektivs. Einige wichtige Faktoren, die die Vitamin D-Serumkonzentration beeinflussen, wie z.B. geographische oder meteorologische Bedingungen waren bei allen untersuchten Patienten gemeinsam. Teilnehmer der LURIC-Studie waren alle Kaukasier aus der Umgebung von Ludwigshafen, Rheinland-Pfalz, die alle an einer einzigen akuten Krankheit litten: dem akuten Koronarsyndrom (ACS). Dies erlaubt die Vermutung, dass alle Patienten einen einigermaßen ähnlichen Lebensstil führten, was den Einfluss anderer Faktoren auf die 25(OH)D-Serumkonzentrationen minimiert. Die angesprochene Homogenität hinsichtlich einer Ethnie der Patienten vermindert zudem das Auftreten einer möglichen Populationsstratifikation, wenngleich allerdings unbekannte Verwandtschaftsbeziehungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden können [44]. Bei der Populationsstratifikation (ethnisches Confounding) kann es zu Verzerrungen in der statistischen Auswertung kommen, wenn Personen unterschiedlicher ethnischer Herkunft betrachtet werden [44].

In der Wang-Arbeit wurden zwischen 1 und 4% der Varianz der 25(OH)D-Konzentration durch die drei identifizierten SNPs erklärt [91]. In der vorliegenden Arbeit betrug der Determinationskoeffizient (R^2) hingegen für die 12 statistisch signifikanten SNPs bzw. für die 46 SNPs, 1,8 bzw. 5,6 %. Diese Ergebnisse bestätigen die Strategie, dass eine Analyse von ausgewählten Kandidatengen relevanten Ergebnisse produzieren kann, selbst dann wenn diese SNPs zuvor nicht in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) detektiert wurden. In der vorliegenden Arbeit fanden sich im Vorauswahl-Test bei 46 SNPs im Vergleich mit der Gesamtkohorte (Median: 15,5 ng/ml) niedrigere bzw. höhere 25(OH)D-Serumkonzentrationen ($p < 0,05$). Im Chi-Quadrat-Test und in der danach durchgeführten Korrektur für multiples Testen erreichten aus diesen 46 insgesamt 12 SNPs, darunter Varianten in den Genen EDN1, EXOC2, MTF, TYR, TYRP1 und PRKACG das geforderte Signifikanzniveau. Diese 12 SNPs ließen sich zwei Gruppen zuordnen: Die erste Gruppe bestand aus einem SNP im EXOC2-Gen (rs9328342). Er erreichte das geforderte Signifikanzniveau und war mit einem Unterschied der 25(OH)D-Serumkonzentration im Vergleich zur Gesamtkohorte von über 5,00 ng/ml assoziiert. Die zweite Gruppe bestand aus 11 SNPs, die in den Genen TYR (n=4: rs10830253, rs7129973, rs4121401 und rs2000553), PRKACG (n=1: rs12001326), EDN1 (n=3: rs16872592, rs16872602 und rs7356986), TYRP1 (n=1: rs2150097) und MTF (n=2: rs13078182 und rs17006281) lokalisiert waren und ebenfalls das geforderte Signifikanzniveau erreichten, aber mit einem Unterschied der 25(OH)D-Serumkonzentration im Vergleich zur Gesamtkohorte von unter 5,00 ng/ml assoziiert waren.

Neben diesen 12 SNPs wurde noch eine dritte Gruppe gefunden: Hierbei handelt es sich um neun SNPs in den Genen DCT (n=1: rs16949906), TYRP1 (n=3: rs1408797, rs16929263 und rs17342340), PRKAR2B (n=1: rs12530875), FGF2 (n=1: rs17407577), OCA2 (n=2: rs16950402 und rs8034368) und EDN3 (rs6123895), die zwar nicht das geforderte Signifikanzniveau erreichten, allerdings mit einem Unterschied der 25(OH)D-Serumkonzentration im Vergleich zur Gesamtkohorte von über 5,00 ng/ml assoziiert waren und im Vorauswahl-Test p-Werte von 0,009 bis 0,039 aufwiesen wurden. Es muss angemerkt werden, dass diese SNPs einen sehr großen Einfluss auf den Vitamin D-Status aufwiesen mit Unterschieden in der 25(OH)D-Serumkonzentration im Vergleich zur Gesamtkohorte von bis zu 10,40 ng/ml. Diese SNPs könnten daher dennoch eine Bedeutung als Marker für Vitamin D-Mangel haben. Die Tatsache, dass sie nicht das geforderte Signifikanzniveau erreichten, könnte dadurch geschuldet sein, dass nur eine relative geringe Anzahl von Personen aus der Gesamtkohorte das relevante Allel aufwiesen, also eine kleine Minorallelfrequenz vorlag.

Die statistische Signifikanz einiger SNPs aus den beiden ersten Gruppen konnte im allelbasierten Test bestätigt werden: Rs10830253 (TYR), rs9328342 (EXOC2), rs4121401 (TYR), rs7129973 (TYR), rs2000553 (TYR), rs13078182 (MITF) und rs17006281 (MITF) erreichten in der Testreihe des rezessiven Modells statistische Signifikanz, während rs12001326 (PRKACG) im multiplikativen Modell und rs2150097 (TYRP1) im dominanten Modell statistische Signifikanz erreichte. Mögliche Verzerrungen im genotypbasierten Test durch ein dominantes, rezessives oder kodominantes Verhalten der Allele konnten dadurch verhindert werden. Die Voraussetzung zur Durchführung des allelbasierten Tests (Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibriums) wurde bei den genannten SNPs erfüllt. Nach Adjustierung für Geschlecht, BMI, Monat der Blutabnahme und Geburtsjahr konnten die drei SNPs rs2150097 (TYRP1), rs7356986 (EDN1) und rs12001326 (PRKACG) ihre statistische Signifikanz beibehalten. Da bereits bekannt ist, dass Vitamin D-Mangel mit einem breiten Spektrum von unabhängigen Krankheiten inklusive dem allgemeinen Überleben von Patienten mit Risiko für KHK assoziiert ist, wurde konsequenterweise auch in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der SNPs an den gefundenen Loci auf die Lebenserwartung analysiert. Jedoch konnte weder in der Kaplan-Meier-Analyse noch in der Cox-Regression einen Einfluss der einzelnen SNPs auf die Gesamtüberlebensrate gefunden werden. Ein Grund dafür kann darin gesehen werden, dass die Varianz von 25(OH)D zu gering gewesen ist, um detektierbare Auswirkungen in der Überlebenszeit zu sehen.

Die Betrachtung der genauen Lage auf der DNS und die Funktion der untersuchten SNPs bzw. deren Gene bringen einige interessante Erkenntnisse: TYR, TYRP1, und DCT repräsentieren Gene, die direkt in die Melaninsynthese eingebunden sind. Tyrosinase ist ein Enzym, das die ersten beiden Schritte der Melaninsynthese katalysiert und ist eines der Schlüsselenzyme zur Bestimmung der Hautpigmentierung [76]. Obwohl wenig über die Effekte dieser SNPs auf die Hautpigmentierung bekannt ist, wurde über den SNP rs1393350, der im TYR- Gen lokalisiert ist, berichtet, dass er einen Einfluss auf die Hautpigmentierung und Sonnenempfindlichkeit hat [64, 82]. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings keine Assoziation von rs1393350 mit der 25(OH)D-Serumkonzentration gefunden.

Die meisten der in der vorliegenden Arbeit analysierten SNPs sind in nichtkodierenden Regionen (Introns) der DNS lokalisiert oder befinden sich stromabwärts oder –aufwärts des dazugehörigen Gens. Sieben SNPs befinden sich innerhalb der kodierenden Sequenz der DNS (Exons). Von diesen sieben SNPs schaffte es aber nur ein SNP im Vorauswahl-Test unter die 46 SNPs zur weiteren Analyse: Dabei handelt es sich um den SNP rs1042602 im TYR-Gen.

Patienten mit dem homozygoten Genotyp des SNP rs1042602 (AA) wiesen eine niedrigere 25(OH)D-Serumkonzentration (Median: 14,25 ng/ml) im Vergleich zur Gesamtkohorte (Median: 15,5 ng/ml) auf (p-Wert= 0,014). In den Folgetests erreichte dieser SNP allerdings keine statistische Signifikanz. Bei rs1042602/A192C handelt es sich um eine nichtsynonyme Substitution (Serin für Tyrosin) [79]. Er hat eine Frequenz von 38 % bei europäischen Kaukasiern, aber nur 14 % bei Nicht-Kaukasier [67]. In einer Studie wurde berichtet, dass das A-Allel einen Einfluss auf die Hautpigmentierung hat und direkt in den unterschiedlichen Melaningehalt zwischen der europäischen und afrikanischen Bevölkerung eingebunden sein könnte [79]. In einer anderen Untersuchung konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden: Sulem et al. berichteten, dass das A-Allel von rs1042602 assoziiert ist mit der Abwesenheit von Sommersprossen aber sie fanden keine Assoziation mit der Haar- oder Augenfarbe [82].

Zumindest einige der analysierten SNPs liegen wahrscheinlich in regulatorischen Regionen, was auch in Tabelle 37 dargestellt ist, wo veränderte Motive einzelner SNPs aufgelistet sind. SNPs, die stromauf- oder abwärts von ihrem Gen lokalisiert sind, können in regulatorischen Abschnitten der DNS liegen, wodurch die Transkriptionsrate des jeweiligen Gens positiv oder negativ beeinflusst werden kann. Auch SNPs, die in Introns liegen können, zum einen regulatorische Bindungsstellen verändern, zum anderen besteht bei Ihnen die Möglichkeit, dass ein Spleißsignal hinzukommt bzw. entfällt, sodass ein verändertes Genprodukt entsteht, was als alternatives Spleißen bekannt ist. Es ist also denkbar, dass die gefundene SNPs dadurch einen positiven oder negativen Einfluss auf die Expression der zugehörigen Gene haben, was den Signalweg in den Melanozyten beeinflusst und letztlich auch den Melaningehalt der Haut. Eine höhere Melaninkonzentration ist in der Lage mehr UVB-Photonen der Sonnenstrahlung zu absorbieren, die notwendig ist für die Produktion von Vitamin D in der menschlichen Haut [13]. Konsequenterweise führen veränderte Melaninkonzentrationen zu einem erhöhten oder erniedrigten 25(OH)D-Gehalt im Blut [13]. Selbst wenn ein SNPs keinen direkten Einfluss auf die Genexpression haben sollte, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass er in Form eines Haplotyps mit anderen SNPs in einem hohen Linkage Disequilibrium vorliegt, und andere SNPs dieses Haplotyps in Exons oder regulatorischen Abschnitten lokalisiert sind, die die Genexpression verändern [82]. Der gefundene SNP wäre dann ein Marker. Allele, die so eng auf einem Chromosom beieinander liegen, dass sie gemeinsam vererbt werden und nicht während der Meiose durch crossing over rekombiniert werden, bilden einen sogenannten Haplotyp [93]. Zwischen diesen Allelen bzw. SNPs besteht dann ein Kopplungsungleichgewicht, was als Linkage Disequilibrium (LD) bezeichnet wird [93].

Zusammenfassend kann als Ergebnis dieser Studie festgehalten werden, dass Varianten von Genen mit Bezug zur Hautpigmentierung die 25(OH)D-Serumkonzentration in der kaukasischen Bevölkerung mit voraussagen können. 12 aus 46 SNPs waren in dieser Studie nach der Korrektur des p-Wertes für multiples Testen mit einem höheren oder niedrigeren 25(OH)D-Serumspiegel im Vergleich mit der Gesamtkohorte assoziiert, von denen drei SNPs auch nach Adjustierung mit anderen starken Einflussfaktoren noch eine statistische Signifikanz zeigten. Betrachtet man die relative hohe Anzahl von am Anfang analysierten SNPs (n= 960) in Bezug zu der relative geringen Anzahl an Individuen, die in der Studie eingeschlossen wurden (n= 2970) und betrachtet man die relative hohe Anzahl an SNPs mit einem p-Wert kleiner 0,05 (n= 46), kann angenommen werden, dass durch eine Erhöhung der Fallzahlen z. B. im Rahmen eines Bestätigungskollektivs, die Ergebnisse dieser Studie verbessert und bestätigt werden. Es kann weiterhin vermutet werden, dass der Einfluss der untersuchten SNPs in dieser Arbeit zu schwach war um detektierbare Änderungen im Gesamtüberleben der Patienten hervorzurufen. Dennoch kann spekuliert werden, ob in zukünftigen Studien, in denen mehr Patienten eingeschlossen werden, diese SNPs einen Einfluss auf das Gesamtüberleben zeigen werden. Trotz der aufgezeigten Vorteile eines homogenen hochselektierten Patientenkollektivs, sollte in zukünftigen Studien die Ergebnisse anhand weiterer Kollektive überprüft werden, da hier noch einige Faktoren wie z.B. Auswirkungen von Medikamenteneinnahmen auf den 25(OH)D-Spiegel nicht untersucht wurden.

Zukünftige Studien sind darüber hinaus notwendig um mehr Details über den genetischen Hintergrund der Variabilität der Hautpigmentierung in den verschiedenen Weltpopulationen und deren Effekte auf die 25(OH)D-Serumkonzentration zu erarbeiten. In diesem Kontext wird es wichtig sein, den Einfluss der genetischen Variationen von den für die Pigmentierung wichtigen Genen auf den Hautphänotyp und deren Korrelation mit der 25(OH)D-Serumkonzentration zu untersuchen. Außerdem müssen diese Studien Hinweise liefern über welchen genauen Mechanismus die natürliche Selektion genau abgelaufen ist bzw. noch abläuft, was im Laufe der Evolution die Variabilität der Hautpigmentierung hervorgerufen hat.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Malek ZA, Ross R, Trinkle L, Swope V, Pike JW, Kordlund JJ (1988) Hormonal effects of vitamin D3 on epidermal melanocytes. *Journal of Cell Physiology* 136:273–280
2. Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M (2008) Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism* 57:183-191
3. Ancans J, Hoogduijn MJ, Thody AJ (2001) Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis, *Journal of Investigative Dermatology* 117:158–159
4. Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, Lappé DL, Muhlestein JB; (2010) Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, diseases status, and incident events in a general healthcare population. *American Journal of Cardiology* 106:963-968
5. Barreto DV, Bareto FC, Liabeuf S, Temmar M, Boitte F, Choukroun G, Fournier A, Massy ZA (2009) Vitamin D affects survival independently of vascular calcification in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 4:1128-1135
6. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57:289-300
7. Black PN, Scragg R (2005) Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and pulmonary function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Chest* 128:3792-3798
8. Brandt U (2007) Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 507-508
9. Brenner M, Berkin C (2010) Grundlagen der Hautpigmentierung, *Biochemie und Regulation der Melaninsynthese*. *Hautarzt* 61:554-560
10. Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology: HaploRegv2, Update 2013.02.14 (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>)
11. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Max Ruber Institut: Nationale Verzehrsstudie 2012, p 110
12. Carrelli AL, Walker MD, Lowe H, McMahon DJ, Rundek T, Sacco RL, Silverberg SJ (2011) Vitamin D deficiency is associated with subclinical carotid atherosclerosis: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 42:2240–2245
13. Chen TC, Lu Z, Holick MF (2010) Photobiology of Vitamin D. In: Holick, MF (ed) *Nutrition and Health: Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. 2nd ed. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London, pp 35-60
14. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D’Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128:853–864

15. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7:684-700
16. DeLuca HF (2008) Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutrition Reviews* 66:73–87
17. Dickenson J, Freeman F, Mills CL, Sivasubramaniam S, Thode C (2013) *Molecular Pharmacology From DNA to Drug Discovery*. Wiley-Blackwell, Chichester, pp 201- 202
18. Dobnig H, Pilz S, Scharnagel H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W (2008) Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of Internal Medicine* 168:1340-1349
19. Engelsen O, Brustad M, Aksnes L, Lund E (2005) Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover, aerosols and cloud thickness. *Photochemistry and Photobiology* 81:1287-1290
20. Erkal MZ, Wilde J, Bilgin Y, Akinci A, Demir E, Bödeker RH, Mann M, Bretzel RG, Stracke H, Holick MF (2006) High prevalence of vitamin D deficiency, secondary hyperparathyroidism and generalized bone pain in Turkish immigrants in Germany: identification of risk factors. *Osteoporosis International* 17:1133–1140
21. Farraye FA, Nimitphong H, Stucchi A, Dendrinios K, Boulanger AB, Vijjeswarapu A, Tannenbaum A, Biancuzzo R, Chen TC, Holick MF (2011) Use a novel vitamin D bioavailability test demonstrates that vitamin D absorption is decreased in patients with quiescent Crohn’s disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 17:2116-2121
22. Fritsch P (2009) *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer, Heidelberg, pp 16-18
23. Fritsch P (2009) *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer, Heidelberg, p 85
24. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, Mullie P, Autier P (2011) Metanalysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostata cancer and colorectal adenoma. *International Journal of Cancer* 128:1414-1424
25. Grant WB, Cross HS, Garland CF, Gorham ED, Moan J, Peterlik M, Porojnicu AC, Reichrath J, Zittermann A (2009) Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 99:104–113
26. Gröber U (2012) Vitamin D als Arzneimittel. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 215-228
27. Hadshiew I (2010) Pigmentstörungen der Haut. In: Moll I (ed) *Duale Reihe Dermatologie*. 7th ed. Thieme, Stuttgart, pp 478-480
28. Harten U (2007) *Physik für Mediziner*. 12th ed. Springer, Heidelberg, pp 246-309
29. Hasilik A (2007) Biosynthese, Modifikation und Abbau von Proteinen. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 288-289

30. Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Müller MJ, Scheidt-Nave C (2008) Vitamin D status and health correlates among German adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 62:1079-1089
31. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:1911-1930
32. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980) Photosynthesis of vitamin D₃ in human skin and its physiologic consequences. *Science* 210:203–205
33. Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH (1981) Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* 211:590-593
34. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* 357:266-282
35. Holick MF (2008) Sunlight, vitamin D and health: A D-lightful story. In: Bjertness E (ed) *Solar Radiation and human Health*. Novus Forlag, Oslo, pp 147-166
36. Holick MF (2008) Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutrition Reviews* 66:182-94
37. Holick MF, Chen T (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *American Journal of Nutrition* 87:1080S-1086S
38. Holick MF (2012) Vitamin D: Sonne, Quellen und die „D-batte“. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 61-88
39. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Trust Genome Campus Hinxton Cambridge, UK
40. Hurst PR von, Stonehouse W, Coad J (2012) Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient –a randomized, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition* 103:549-555
41. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM (2001) Intake of vitamin D and risk of type I diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358:1500-1503
42. Jablonski NG, Chaplin G (2000) The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution* 39:57-106
43. Klapdor S, Richter E, Klapdor R (2012) Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und Mangel an fettlöslichen Vitaminen unter besonderer Berücksichtigung des Vitamin D. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 199-204
44. Knowler WC, Williams RC, Pettitt DJ, Steinberg AG (1988) Gm'35'13,14 and Type 2 Diabetes Mellitus: An Association in American Indians with Genetic Admixture. *American Journal of Human Genetics* 43:520-526
45. Köhrle J, Petrides P (2007) Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 862-863

46. Krause R, Roth HJ, Haas K, Edenharter G, Schober-Halstenberg HJ (2008) Vitamin D-Status bei terminal Nierenkranken in Deutschland. *Nieren- u. Hochdruckkr.* 37 Abstracts
47. Krause R, Schober-Halstenberg HJ, Edenharter G, Hopfenmüller W, Roth HJ, Holick MF (2012) Vitamin D und Niere- chronische Niereninsuffizienz, Morbidität und Mortalität. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 155-162
48. Krutmann J, Schröder P, Akimichi M (2008) Molekulare Mechanismen der Hautalterung durch UV-Strahlung und andere exogene Noxen. In: Krutmann J, Diepgen T, Billmann-Krutmann C (eds) *Hautalterung*. 2nd ed. Springer, Heidelberg, pp 23-36
49. Lalueza-Fox C, Römpler H, Caramelli D, Stäubert C, Catalano G, Hughes D, Rohland N, Pilli E, Longo L, Condemi S, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Stoneking M, Schöneberg T, Bertranpetit J, Hofreiter M (2007) A Melanocortin 1 Receptor Allele Suggests Varying Pigmentation Among Neanderthals. *Science* 318:1453-1455
50. Lehmann B (2012) Zur Physiologie des Vitamin D. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 1-12
51. Lester E, Skinner RK, Wills MR (1977) Seasonal variation in serum 25-hydroxyvitamin D in the elderly in Britain. *Lancet* 1:979–980
52. Lewis CM, Knight J (2012) Introduction to Genetic Association Studies. *Cold Spring Harbor Protocols* 297-306
53. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR (2010) MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genetic Epidemiology* 34: 816-834
54. Löffler G (2007) Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 32-44
55. Löffler G (2007) Stoffwechsel von Glucose und Glykogen. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 358-396
56. Löffler G (2007) Stoffwechsel von Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Cholesterin. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 564-570
57. Löffler G, Brigelius-Flohé R (2007) Vitamine. In: Löffler G, Petrides P, Heinrich P (eds) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Heidelberg, pp 680-691
58. MacLaughlin JA, Holick MF (1985) Aging Decreases the Capacity of Human Skin to Produce Vitamin D₃. *The Journal of Clinical Investigation* 76:1536–1538
59. Mang R, Krutmann J (2003) Sun protection during holidays. *Hautarzt* 54:498-505
60. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005) Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 48:1247-1257
61. Matsuoka LY, Wortsman J, Hanifan N, Holick MF (1988) Chronic sunscreen use decreases circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D: a preliminary study. *Archives of Dermatology* 124 Abstracts

-
62. McGrath J, Selten JP, Chant D (2002) Long-term trends in sunshine duration and its association with schizophrenia birth rates and age at first registration — data from Australia and the Netherlands. *Schizophrenia Research* 54:199-212
 63. Morris HA, Anderson PH (2010) Autocrine and paracrine actions of vitamin D. *The Clinical Biochemist Reviews* 31: 129-138
 64. Nan H, Kraft P, Hunter DJ, Han J (2009) Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer. *International Journal of Cancer* 125:909-917
 65. Negri AI (2006) Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/25(OH)D3 complex. *Nephrology (Carlton)* 11:510-515
 66. Norman AW (2008) From vitamin D to hormone: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *American Journal of clinical nutrition* 88:4915-4995
 67. Norton HL, Kittles RA, Parra E, McKeigue P, Mao X, Cheng K, Canfield VA, Bradley DG, McEvoy B, Shriver MD (2007) Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. *Molecular Biology and Evolution* 24:710-722
 68. Putz-Bankuti C, Pilz S, Stojakovuc T, Scharnagel H, Pieber TR, Trauner M, Obermayer-Pietsch B, Stauber RE (2010) Association of 25-hydroxyvitamin D levels with liver dysfunction and mortality in chronic liver disease. *Liver International* 32:845-851
 69. Rees JL, Harding RM (2012) Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics. *Journal of Investigative Dermatology* 132:846-853
 70. Relethford JH (2012) *Human Population Genetics*. Wiley-Blackwell, Hoboken (NJ), pp 31-37
 71. Renz-Polster H, Krautzig S (2008) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4th ed. Urban & Fischer, München, pp 602-611
 72. Renz-Polster H, Krautzig S (2008) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4th ed. Urban & Fischer, München, pp 797-805
 73. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2009) Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* 169:505-514
 74. Sasieni PD (1997) From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53:1253-1261
 75. Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K (2005) Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. *Cerebrovascular Diseases* 20:187-192
 76. Scherer D, Kumar R (2010) Genetics of pigmentation in skin cancer – A review. *Mutation Research* 705:141-153
 77. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamahita T (2004) Targeted ablation of FGF23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 113:561-568

78. Shinkyo R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K (2004) Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324: 451-457
79. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, Pfaff C, Jones C, Massac A, Cameron N, Baron A, Jackson T, Argyropoulos G, Jin L, Hoggart CJ, McKeigue PM, Kittles RA (2003) Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human Genetics* 112:387–399
80. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2013
81. Sturm RA (2009) Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics* 18:R9-R17
82. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, Manolescu A, Karason A, Palsson A, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Steinberg S, Pálsson S, Jonasson F, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediktsdottir KR, Aben KK, Kiemenev LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2007) Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics* 39:1443-1452
83. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux LM, Hearing VJ, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA (1997) Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *Journal of Investigative Dermatology* 108:838–842
84. Tan CY, Strathum B, Marks R (1982) Skin thickness measurement by pulsed ultrasound: its reproducibility, validation and variability. *British Journal of Dermatology* 106:657–667
85. Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta Ak, Frieden R, Chen TS, Salen G (1994) Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *New England Journal of Medicine* 330:107-113
86. Tsatmali M, Ancans J, Yukitake J, Thody AJ (2000) Skin POMC peptides: their actions at the human MC-1 receptor and roles in the tanning response. *Pigment Cell Research* 13:125–129
87. Uyen LDP, Nguyen DH, Kim EK (2008) Mechanism of Skin Pigmentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13:383-395
88. Vicchio D, Yergey A, O'Brien K, Allen L, Ray R, Holick MF (1993) Quantification and Kinetics of 25-Hydroxyvitamin D3 by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Thermospray Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 22:53-58
89. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M (2010) Wie bewertet man die p-Wert-Flut? *Deutsches Ärzteblatt* 107:50–56
90. Vieth R (2012) Korrektur von Vitamin D-Mangel durch Supplementierung. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 175-186
91. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Peltonen L, Cooper JD, O'Reilly PF, Houston DK, Glazer NL, Vandenput L, Peacock M, Shi J, Rivadeneira F, McCarthy MI, Anneli P, de Boer IH, Mangino M, Kato B, Smyth DJ, Booth SL, Jacques PF, Burke GL, Goodarzi M, Cheung CL, Wolf M, Rice K, Goltzman D, Hidioglou N, Ladouceur M, Wareham NJ, Hocking LJ, Hart D, Arden NK, Cooper C, Malik S, Fraser WD, Hartikainen AL, Zhai G, Macdonald HM, Forouhi NG,

- Loos RJ, Reid DM, Hakim A, Dennison E, Liu Y, Power C, Stevens HE, Jaana L, Vasan RS, Soranzo N, Bojunga J, Psaty BM, Lorentzon M, Foroud T, Harris TB, Hofman A, Jansson JO, Cauley JA, Uitterlinden AG, Gibson Q, Järvelin MR, Karasik D, Siscovick DS, Econs MJ, Kritchevsky SB, Florez JC, Todd JA, Dupuis J, Hyppönen E, Spector TD (2010) Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 376:180-188
92. Webb AR, Decosta BR, Holick MF (1989) Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D3 by Causing Its Photodegradation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 68:882-887
93. Wegener C, Müller O (2010) Molekulare - Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3th ed. Thieme, Stuttgart, pp Seite 33-34
94. Winkelmann BR, Marz W, Boehm BO, Zotz R, Hager J, Hellstern P, Senges J (2001) Rationale and design of the LURIC study - a resource for functional genomics, pharmacogenomics and long-term prognosis of cardiovascular disease. *Pharmacogenomics* 2:1-73
95. Witham MD, Nadir MA, Struthers AD (2009) Effect of Vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension* 27:1948-1954
96. Worm N (2012) Ausmaß der Mangelsituation – warum man dieses Vitamin nicht essen kann. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 25-32
97. Wunsch A (2012) Zur biologischen Wirkung von Sonnenlicht. In: Reichrath J, Lehmann B, Spitz J (eds) *Vitamin D-Update 2012 - Von der Rachitisprophylaxe zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, pp 42-55
98. Ye SQ (2008) SNP and Haplotype Analyses. In: Ye SQ (ed) *Bioinformatics A practical approach*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton (FL), pp 108-124
99. Yokoyama S, Fisher DE (2011) Transcriptional Regulation in Melanoma. In: Bosserhoff AK (ed) *Melanoma Development Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*. Springer, Wien New York, p 82
100. Zittermann A, Gummert JF (2010) Sun, vitamin D, and cardiovascular diseases. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 101:124-129

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: 25(OH)D-Mangel nach [30]	5
Tabelle 2: 25(OH)D-Defizienz und -Insuffizienz nach [37]	5
Tabelle 3: Übersicht über wichtige Vitamin D Derivate nach [13, 38]	8
Tabelle 4: Hauttypen nach Fitzpatrick	24
Tabelle 5: In dieser Arbeit analysierte Gene	28
Tabelle 6: Aufteilung der Gesamtkohorte in Tertile	32
Tabelle 7: Beispiel für einen SNP erstellte Kreuztabelle für den Chi-Quadrat-Test	32
Tabelle 8: Output des SPSS-Programms zur Beurteilung der statischen Signifikanz obiger Kreuztabelle (Tabelle 7) nach Chi-Quadrat-Test	33
Tabelle 9: Berechnung der erwarteten Genotypverteilung mit Hilfe der Allelfrequenzen (p und q) und der Anzahl (N) der Individuen der Population, Grundlage für den Chi-Quadrat-Test zur Testung ob ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegt	34
Tabelle 10: Test auf Normalverteilung	38
Tabelle 11a: Dargestellt sind die im Vorauswahl- Test identifizierten SNPs ($p < 0,05$), die im seltenen Allel im Vergleich zur Gesamtkohorte einen geringeren 25(OH)D-Serumspiegel aufweisen, geordnet vom größten Unterschied ausgehend.	40
Tabelle 11b: Dargestellt sind die im Vorauswahl-Test identifizierten SNPs ($p < 0,05$), die im seltenen Allel im Vergleich zur Gesamtkohorte einen höheren 25(OH)D-Serumspiegel aufweisen, geordnet vom größten Unterschied ausgehend	43
Tabelle 12: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYR1rs16929263	46
Tabelle 13: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYR1rs17342340	46
Tabelle 14: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs16950402	46
Tabelle 15: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EXOC2rs9328342	47
Tabelle 16: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs3794602	47
Tabelle 17: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs3829488	47
Tabelle 18: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGrs9314841	47
Tabelle 19: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs10830253	48
Tabelle 20: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs7129973	48
Tabelle 21: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs4121401	48
Tabelle 22: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRrs2000553	48
Tabelle 23: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGrs12001326	49
Tabelle 24: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGrs37363609	49
Tabelle 25: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für SLC24A4rs8003333	49
Tabelle 26: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs16872592	49
Tabelle 27: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs16872602	50
Tabelle 28: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für EDN1rs7356986	50

Tabelle 29:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für OCA2rs17652091	50
Tabelle 30:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für ATF1rs10876099	50
Tabelle 31:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs7043787	51
Tabelle 32:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für PRKACGr3763608	51
Tabelle 33:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für TYRP1rs2150097	51
Tabelle 34:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für MITFr313078182	51
Tabelle 35:	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests für MITFr317006281	52
Tabelle 36:	Benjamini-Hochberg Prozedur für alle 24 SNPs, die im Chi-Quadrat-Test einen p-Wert < 0,05 hatten. Die ersten 12 SNPs sind nach diesem Verfahren statistisch signifikant.	52
Tabelle 37:	Dargestellt sind alle 12 nach dem Chi-Quadrat-Test und dem Korrekturverfahren für multiples Testen statistisch signifikanten SNPs, geordnet vom kleinsten p-Wert ausgehend. Außerdem sind die veränderten Motive auf der DNS aufgelistet.	54
Tabelle 38:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs10830253 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	55
Tabelle 39:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs9328342 (EXOC2). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	55
Tabelle 40:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs4121401 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	55
Tabelle 41:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs7129973 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	56
Tabelle 42:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs16872592 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	56
Tabelle 43:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs16872602 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	56
Tabelle 44:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs7356986 (EDN1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	56
Tabelle 45:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs12001326 (PRKACG). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	57
Tabelle 46:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs2000553 (TYR). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	57
Tabelle 47:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs13078182 (MITF). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	57
Tabelle 48:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs2150097 (TYRP1). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	57
Tabelle 49:	Test auf HWE. Kreuztabelle für rs17006281 (MITF). Vorliegen eines HWE, da das beobachtete $\chi^2 < \chi^2_{\text{krit}}$ ist	58
Tabelle 50:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs10830253 (TYR), G-Allel rezessiv	58
Tabelle 51:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs4121401 (TYR), C-Allel rezessiv	58
Tabelle 52:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs9328342 (EXOC2), T-Allel rezessiv	59
Tabelle 53:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs7129973 (TYR), G-Allel rezessiv	59
Tabelle 54:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs12001326 (PRKACG), G-Allel rezessiv	59
Tabelle 55:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs2000553 (TYR), C- Allel rezessiv	59
Tabelle 56:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs13078182 (MITF), C- Allel rezessiv	59
Tabelle 57:	Ergebnisse des rezessiven Tests für rs17006281 (MITF), A-Allel rezessiv	60
Tabelle 58:	Ergebnisse des dominanten Tests für rs12001326 (PRKACG), G-Allel dominant	60
Tabelle 59:	Ergebnisse des dominanten Tests für rs2150097 (TYRP1), G- Allel dominant	60

Tabelle 60:	Ergebnisse des multiplikativen Tests für rs4121401 (TYR)	60
Tabelle 61:	Ergebnisse des multiplikativen Tests für rs12001326 (PRKACG)	61
Tabelle 62:	Übersicht über die p-Werte der allelbasierten Tests der 12 identifizierten SNPs	61
Tabelle 63:	Ergebnisse der Adjustierung (multiple lineare Regression)	62
Tabelle 64:	Ergebnisse der Cox-Analyse	75

7.2. Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abbildung 1:	Abgebildet ist der Pigmentierungssignalweg. POMC: Proopiomelanocortin; α -MSH: Melanozyten stimulierendes Hormon; MC1R: Melanocortin 1 Rezeptor; AC: Adenylatezyklase; cAMP:3',5'-zyklisches AMP; PKA: Proteinkinase A; CREB1: CAMP responsive element binding protein 1; ATF1: cAMP –abhängiger Transkriptionsfaktor ATF-1; MITF: Microphthalmia-assoziiierter Transkriptionsfaktor; TYR: Tyrosinase; TYRP1: Tyrosinase-related protein 1; DCT: Dopachromtautomerase. α -MSH bindet an seinen Rezeptor MC1R, was eine Signalkaskade startet, an deren Ende die Enzyme für die Melaninsynthese TYR, TYRP1 und DCT vermehrt gebildet werden.	23
Abbildung 2:	Abgebildet sind die Reaktionsschritte der Melaninsynthese im Melanosom. Die beteiligten Enzyme sind eingekreist: TYR: Tyrosinase; TYRP1: Tyrosinase-related protein 1; DCT: Dopachromtautomerase. Modifiziert nach [27].	23
Abbildung 3:	Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele im multiplikativen Modell (beide Alle kodominant)	35
Abbildung 4:	Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele, wenn das A-Allel dominant ist	36
Abbildung 5:	Zuordnungsprinzip der Genotypen zu einem der beiden Allele, wenn das A-Allel rezessiv ist	36
Abbildung 6:	Häufigkeitsverteilung der 25(OH)D-Serumspiegel	38
Abbildung 7:	Kaplan-Meier-Kurve für rs10830253 (TYR)	63
Abbildung 8:	Kaplan-Meier-Kurve für rs9328342 (EXOC2)	64
Abbildung 9:	Kaplan-Meier-Kurve für rs4121401 (TYR)	65
Abbildung 10:	Kaplan-Meier-Kurve für rs7129973 (TYR)	66
Abbildung 11:	Kaplan-Meier-Kurve für rs16872592 (EDN1)	67
Abbildung 12:	Kaplan-Meier-Kurve für rs16872602 (EDN1)	68
Abbildung 13:	Kaplan-Meier-Kurve für rs7356986 (EDN1)	69
Abbildung 14:	Kaplan-Meier-Kurve für rs12001326 (PRKACG)	70
Abbildung 15:	Kaplan-Meier-Kurve für rs2000553 (TYR)	71
Abbildung 16:	Kaplan-Meier-Kurve für rs13078182 (MITF)	72
Abbildung 17:	Kaplan-Meier-Kurve für rs2150097 (TYRP1)	73
Abbildung 18:	Kaplan-Meier-Kurve für rs17006281 (MITF)	74
Abbildung 19:	Schematische Zusammenfassung der durchgeführten Analyseschritte	76

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Jörg Reichrath, für seine gute und vorbildliche Betreuung und seine ruhige, unkomplizierte Herangehensweise an das Lösen sämtlicher Probleme, für die er immer ein offenes Ohr hatte.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Marcus Kleber und Herrn Prof. Dr. med. Winfried März vom Mannheimer Institut für Public Health für die Bereitstellung der Daten, Herrn Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Stefan Pilz, PhD von der medizinischen Universität Graz für das Korrekturlesen des geplanten Papers, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Gräber und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Wagenpfeil für die statistische Betreuung, sowie dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Vogt.

Besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie für die große Unterstützung.

